

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>12</b>
1.1.	Der Geruchssinn .....	12
1.2.	Anatomie und Informationsfluß im Olfaktorischen System .....	13
1.3.	Struktur von Olfaktorischen Rezeptoren und ihrer Gene .....	14
1.4.	Signaltransduktion in olfaktorischen Neuronen.....	17
1.5.	Expression von Olfaktorischen Rezeptor (OR) Genen .....	18
1.6.	HLA (Human Leucocyte Antigen), HLA-gekoppelte Olfaktorische Rezeptorgene und der Fortpflanzungserfolg .....	18
1.7.	Zielsetzung der Arbeit .....	21
1.7.1.	Untersuchung der genetischen Kopplung zwischen HLA und olfaktorischen Genen .....	21
1.7.2.	Analyse der Expression von HLA-gekoppelten OR Genen in verschiedenen humanen Geweben .....	22
1.7.3.	Analyse der genomischen Organisation von einzelnen HLA-gekoppelten OR Genen .....	22
<b>2.</b>	<b>Material</b>	<b>23</b>
2.1.	Humane Zelllinien .....	23
2.2.	Chemikalien und Materialien.....	23
2.3.	Geräte .....	25
2.4.	Medien.....	26
2.5.	Puffer und Lösungen.....	27
2.6.	Vektoren .....	31
2.7.	Primer und Bedingungen für die Polymerasekettenreaktion .....	32
2.7.1.	Oligonukleotide für die Polymorphismus-Analyse .....	32
2.7.2.	Oligonukleotide für RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).....	33
2.7.2.1.	Äußere genspezifische Primer für die 5' RACE .....	33
2.7.2.2.	Innere genspezifische Primer für die 5' RACE .....	33
2.7.2.3.	Äußere genspezifische Primer für die 3' RACE .....	34
2.7.2.4.	Innere genspezifische Primer für die 3' RACE .....	34
2.7.2.5.	Genspezifische Primer in den letzten beiden Domänen der kodierenden Region der OR Gene .....	35
2.7.2.6.	Primer für die spezifische PCR .....	35
2.7.3.	Plasmidspezifische Oligonukleotide .....	36
2.7.4.	OR-cDNA spezifische Primer .....	36
2.7.5.	Oligonukleotide für die Sequenzreaktion.....	36
2.7.6.	Primer für konstitutiv exprimierte Haushaltsgene .....	37
2.7.7.	Sonstige Primer .....	37
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>38</b>
3.1.	Zellkultur.....	38
3.1.1.	Züchtung von Zelllinien.....	38
3.1.2.	Einfrieren, Lagerung und Auftauen von Zelllinien .....	38
3.2.	Isolierung genomischer DNA .....	38

---

3.2.1.	Phenolextraktion .....	38
3.3.	Isolierung von Gesamt RNA.....	39
3.3.1.	RNAgents®Total RNA Isolation System (Promega) .....	39
3.3.2.	peqGOLD TriFast™ (peqLab).....	39
3.4.	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA .....	40
3.4.1.	Photometrische Bestimmung .....	40
3.4.2.	Picogreen-Messung .....	40
3.5.	Gelelektrophorese.....	40
3.5.1.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	41
3.5.2.	Agarose-Gelelektrophorese .....	41
3.5.3.	RNA-Gele.....	41
3.5.4.	Denaturierendes Polyacrylamid-Gel für Sequenzanalysen .....	42
3.6.	Nachweis gelelektrophoretisch aufgetrennter Moleküle .....	43
3.6.1.	Fluoreszenzfärbung mit Ethidiumbromid .....	43
3.6.2.	Fluoreszenzfärbung mit SYBR-Green .....	43
3.7.	DNA-Isolierung aus Gelen.....	43
3.7.1.	DNA-Isolierung aus Polyacrylamid-Gelen .....	43
3.7.1.1.	DNA-Elution durch Diffusion .....	43
3.7.1.2.	Elektroelution .....	44
3.7.2.	DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen .....	44
3.7.2.1.	DNA-Elution durch Diffusion .....	44
3.7.2.2.	DNA-Elution mit einer Absorber-Emulsion .....	44
3.8.	Fällung von Nukleinsäuren.....	45
3.8.1.	Ethanol-Fällung.....	45
3.8.2.	Isopropanol-Fällung .....	45
3.9.	Entfernung niedermolekularer Stoffe aus DNA-Lösungen.....	45
3.9.1.	Gelfiltration .....	45
3.9.2.	Dialyse .....	45
3.10.	Polymerasekettenreaktion .....	46
3.10.1.	PCR aus Plasmid-DNA.....	46
3.11.	DNA-Sequenzierung .....	47
3.11.1.	Sequenzier-PCR-Ansatz.....	47
3.11.2.	Automatisierte Sequenzanalyse .....	48
3.12.	Herstellung von cDNA .....	48
3.13.	Hybridisierung.....	49
3.13.1.	Radioaktive Markierung .....	49
3.13.1.1.	Markierung der Sonde .....	49
3.13.1.2.	Radioaktive Hybridisierung.....	49
3.13.1.3.	Autoradiographie .....	50
3.13.2.	Nichtradioaktive Markierung .....	50
3.13.2.1.	Markierung der Sonde .....	50
3.13.2.2.	Nichtradioaktive Hybridisierung .....	51

---

3.13.2.3. Detektion.....	51
3.14. Transformation.....	51
3.14.1. Herstellung elektrokompetenter Zellen.....	51
3.14.2. Transformation.....	52
3.14.2.1. Elektroporation.....	52
3.14.2.2. Hitzeschock.....	52
3.14.3. Dauerkulturen.....	52
3.14.4. Animpfen.....	52
3.15. Plasmidisolierung.....	53
3.15.1. (Mini-) Plasmid-Präparation.....	53
3.15.2. (Midi-) Plasmid-Präparation.....	53
3.16. Restriktionsenzymverdau.....	54
3.17. Ligation.....	55
3.17.1. Ligation mit T4-Ligase.....	55
3.17.2. Ligation ohne Ligase.....	55
3.18. Southern Blotting.....	55
3.18.1. Southern-Blot, gravitationsunterstützt.....	55
3.18.2. Southern-Blot, spannungsunterstützt.....	56
3.19. <i>In-situ</i> -Hybridisierung.....	56
3.19.1. Herstellung von einzelsträngigen RNA-Sonden.....	57
3.19.2. Paraffinschnitte.....	58
3.19.3. Hybridisierung.....	58
3.19.4. Silikonisierung von Deckgläschen.....	59
3.19.5. Waschen nach der Hybridisierung.....	59
3.19.6. Beschichten der Objektträger mit Fotoemulsion.....	60
3.19.7. Entwickeln.....	60
3.20. Angewendete Programme.....	60
<b>4. Ergebnisse und Auswertung.....</b>	<b>61</b>
4.1. Polymorphismusanalyse und Definition von OR-Haplotypen.....	61
4.1.1. OR Pseudogene.....	63
4.1.2. OR Gene mit einem offene Leseraster (ORF).....	64
4.1.3. Aminosäure (AS) Austausch in den OR.....	66
4.1.4. OR Gene mit potentiell funktionstüchtigen Allelen u. nicht funktionstüchtigen Allelen.....	66
4.1.5. Anzahl der OR Allele.....	69
4.1.6. OR Haplotypen.....	69
4.2. Expressionsanalyse.....	72
4.2.1. Spezifität von OR Sonden.....	72
4.2.2. HLA-gekoppelte OR Transkripte in verschiedenen Organen.....	78
4.2.3. <i>In-situ</i> -Hybridisierung.....	82
4.3. Genomische Organisation von ausgewählten HLA-gekoppelten OR Genen.....	82

---

4.3.1.	Suche von HLA-gekoppelten OR Transkripten in verschiedenen cDNA Bibliotheken mit Hilfe der radioaktiven Hybridisierung.....	82
4.3.2.	Suche von HLA-gekoppelten OR Transkripten in verschiedenen cDNA Bibliotheken mit Hilfe von RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).....	84
4.3.2.1.	5' RACE: Primerdesign, PCR und nachfolgende Analyse .....	85
4.3.2.2.	Analyse der RACE-Produkte .....	86
4.3.2.3.	Genomische Organisation der 5' UTR HLA-gekoppelter OR Gene .....	89
4.3.2.4.	3' RACE: Primerdesign, PCR und nachfolgende Analyse .....	92
4.3.2.5.	Ergebnisse der 3' RACE und Länge der gefundenen Transkripte .....	93
4.3.3.	Analyse der 3' UTR und der kodierenden Region .....	97
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>100</b>
5.1.	Polymorphismusanalyse .....	100
5.1.1.	OR-Pseudogene .....	100
5.1.2.	Aminosäuresubstitutionen innerhalb der ORs .....	102
5.1.3.	Definition von Haplotypen .....	105
5.2.	Vorkommen von HLA-gekoppelten OR Genen bei verschiedenen Säugetieren.....	106
5.3.	Expression von HLA-gekoppelten OR Genen in verschiedenen Geweben .....	108
5.4.	Genomische Organisation der HLA-gekoppelten OR Gene .....	110
5.4.1.	Differentielle Polyadenylierung von HLA-gekoppelten OR Genen .....	111
5.4.2.	Genomische Organisation der 5' UTR von HLA-gekoppelten OR Genen.....	112
5.4.3.	Genomische Organisation der 3' UTR und der kodierenden Region von HLA-gekoppelten OR Genen .....	114
5.5.	Ausblick.....	117
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>119</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>122</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>134</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>136</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: OR-Familien _____	15
Abb. 2: Alignment von 15 HLA-gekoppelten Olfaktorischen Rezeptor Proteinen _____	16
Abb. 3: Olfaktorische Signaltransduktion _____	17
Abb. 4: Chromosom 6 Ideogramm _____	20
Abb. 5: OR Pseudogene in der Nähe des HLA-Komplexes _____	63
Abb. 6: Häufigkeit der Mutationen bei allen analysierten HLA-gekoppelten OR Genen _____	65
Abb. 7: Alignment von <i>hs6M1-3</i> und <i>-6</i> . _____	65
Abb. 8 Alignment von <i>hs6M1-3</i> , <i>-4P</i> , <i>-5P</i> und <i>-6</i> . _____	73
Abb. 9: Alignment von <i>hs6M1-12</i> , <i>-13P</i> und <i>-16</i> . _____	74
Abb. 10: Hybridisierungsergebnisse eines Southern-Blots _____	75
Abb. 11 Autoradiographien von vier exemplarisch ausgewählten Southern-Blots _____	76
Abb. 12: Autoradiographien von einem Dot-Blot mit humaner RNA _____	80
Abb. 13: Schematische Darstellung der Marathon-Ready™ cDNA Bibliothek _____	84
Abb. 14: Schematische Darstellung des Primer-Designs für die 5' RACE _____	85
Abb. 15: 5' RACE PCR-Produkte und Autoradiographien _____	88
Abb. 16: Autoradiographie eines Blots mit 5' RACE Produkten aus Hoden cDNA _____	89
Abb. 17: Schematische Darstellung der 5' UTR von sechs HLA-gekoppelten OR Genen _____	91
Abb. 18: Position der genspezifischen 3' RACE Primer _____	92
Abb. 19: Alignment der gefundenen <i>hs6M1-21</i> Transkripte _____	94
Abb. 20: Alignment der gefundenen <i>hs6M1-16</i> Transkripte _____	96
Abb. 21: Schematische Darstellung der Primerposition, um die 3' UTR zu finden. _____	97
Abb. 22: Schematische Darstellung der Primerposition für die spezifischen Amplifizierung _____	98
Abb. 23: Gefundene Transkripte von <i>hs6M1-27</i> _____	98
Abb. 24: Gefundene Transkripte von <i>hs6M1-16</i> . _____	99

---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Humane HLA-typisierte Zelllinien _____	23
Tab. 2: Primer für die Polymorphismusanalyse _____	33
Tab. 3: Äußere genspezifische Primer für die 5' RACE _____	33
Tab. 4: Innere genspezifische Primer für die 5' RACE _____	34
Tab. 5: Äußere genspezifische Primer für die 3' RACE _____	34
Tab. 6: Innere genspezifische Primer für die 3' RACE _____	35
Tab. 7: Genspezifische Primer im letzten Drittel der kodierenden Region _____	35
Tab. 8: Spezifische Primer in der 5' und 3' UTR _____	36
Tab. 9: Plasmidspezifische Oligonukleotide _____	36
Tab. 10: OR-cDNA spezifische Primer _____	36
Tab. 11: Sequenzieroligonukleotide _____	37
Tab. 12: Primer für Haushaltsgene _____	35
Tab. 13: Sonstige Primer _____	37
Tab. 14 : Nukleotid- und Aminosäuresubstitutionen HLA-gekoppelter Pseudogene _____	64
Tab. 15: Nukleotid- und Aminosäuresubstitutionen bei OR Genen _____	67
Tab. 16: OR Allele und Haplotypen in zehn analysierten Zelllinien _____	71
Tab. 17: Autoradiographie-Ergebnisse eines Dot-Blots mit humaner RNA _____	81

**Abkürzungsverzeichnis**

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
$\alpha$ [ <sup>32</sup> P]dCTP	Desoxycytidin 5'- [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] Triphosphat
AS	Aminosäure
BAC	Bacterial artificial chromosome
BL	Burkitt Lymphom
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CP	Cytoplasmatische Domäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	N, N - Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	1,4-Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC	Extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	Expressed Sequence Tag (Exprimierter Sequenzabschnitt)
EtBr	Ethidiumbromid
FA	Formaldehyd
FCS	Fötale Kälberserum (Fetal Calf Serum)
h	Stunde
HBSS	Hanks' Balanced Saltsolution
HLA	Human Leukocyte Antigen
IRD	Infra Red Dye
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
Kann	Kanamycin
M	molar (Mol/Liter)
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
MOE	Olfaktorisches Epithel (Main olfactory epithelium)
M-OR	olfaktorischer Rezeptor der MOE-Familie
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure (Morpholinopropane sulfonic acid)
B-EBV	EBV-transformierte B-Zelle
OD	Optische Dichte
OR	Olfaktorischer Rezeptor
PA	Polyacrylamid
PAC	P1 derived bacterial artificial chromosome
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends

---

RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard Saline Citrat (Citrat gepufferte Salzlösung)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembran Domäne
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
ÜN	über Nacht
UTR	untranslatierte Region (untranslated region)
VNO	Vomeronasalorgan
V1R	Rezeptor der VNO-1 Familie
V2R	Rezeptor der VNO-2 Familie
V3R	Rezeptor der VNO-3 Familie
X-GAL	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid