

6. Zusammenfassung

Olfaktorische Rezeptoren (OR) gehören zur Familie der Proteine mit sieben Transmembran (TM) Domänen. Entsprechend ihrer Spezifität reagieren sie auf extrazelluläre chemische Stoffe mit einer Signaltransduktion ins Zellinnere. Bei HLA-gekoppelten OR wird vermutet, daß sie bei der Perzeption individualspezifischer Körpergerüche mitwirken und somit einen Beitrag zur geruchsbedingten Präferenz für potentielle Partner leisten. Da Produkte des HLA-Komplexes zum individualspezifischen Geruch beitragen, postuliert die Hypothese, daß HLA-Haplotypen gerochen werden können. Um diese Hypothese zu festigen, sollten bestimmte OR Haplotypen bestimmten HLA-Haplotypen mit Hilfe einer Polymorphismusanalyse zugeordnet werden. Insgesamt wurden 13 potentiell funktionstüchtige und neun OR Pseudogene in zehn verschiedenen HLA-homo- oder hemizygoten Zelllinien untersucht. Alle analysierten Gene mit einem offenen Leseraster (ORF) sind polymorph, wobei sowohl stille Austausche, wie auch konservative und nicht konservative Aminosäure (AS) Substitutionen gefunden wurden, und zwar in allen OR Domänen bis auf EC4 und TM7. Von den analysierten zehn Zelllinien und 13 HLA-gekoppelten OR Genen mit ORF konnten mindestens 13 verschiedene Haplotypen abgeleitet werden, die die Grundlage für individuelle Geruchspräferenzen bilden könnten.

Drei analysierte Gene weisen in einigen Zelllinien intakte Allele auf, während sie in anderen Zelllinien keine funktionstüchtigen Allele besitzen. Individuen, die homozygot für ein derartiges inaktives Allel sind, könnten Symptome einer spezifischen Anosmie aufweisen. Vorläufig ist noch ungeklärt, inwieweit AS Substitutionen die Ligandenspezifität oder die Interaktion mit Proteinen der Signal-Transduktions-Kaskade beeinflussen, weil die spezifischen Liganden dieser Rezeptoren noch unbekannt sind.

OR kommen nicht nur im olfaktorischen Epithel, sondern auch in anderen Organen vor. Für sechs der OR Gene wurde deshalb die Expression in 50 Geweben mit Hilfe eines Northern-Blots analysiert. Zwei der getesteten Gene zeigen eine spezifische Expression in nur jeweils drei verschiedenen Organen, während die anderen vier Gene fast im gesamten Organismus gefunden wurden. Umgekehrt exprimieren manche Organe nur bestimmte HLA-gekoppelte OR, andere jedoch ein breites Spektrum. Die Analyse dreier cDNA-Bibliotheken aus Hoden, Lunge und Niere ergab u.a., daß im Hoden 13 von 14 analysierten HLA-gekoppelten OR Genen exprimiert werden, in der Lunge und der Niere dagegen nur vier bzw. fünf.

Um Hinweise auf die Promotorregion von HLA-gekoppelten OR Genen zu bekommen, wurde die genomische Struktur einiger humaner HLA-gekoppelter OR Gene charakterisiert. Mit Hilfe von RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) wurden die 3' und 5' Enden von ausgewählten HLA-gekoppelten OR Genen in Hoden, Niere und Lunge untersucht. Dabei

wurden zahlreiche Befunde erhoben, die zumindest für G-gekoppelte Rezeptoren mit sieben TM Domänen neu sind:

- Nur fünf dieser Gene wiesen zusätzliche 5' nicht kodierende Exons auf.
- Drei der Gene (*hs6M1-21*, *-27* und *-18*) wiesen ein gemeinsames erstes 5' Exon auf, das bei *hs6M1-21* ca. 110 kb stromaufwärts vom Start-Codon lag.
- Die Distanz zwischen dem ersten 5' Exon von *hs6M1-16*, das zentromer dieser drei Gene liegt und eine entgegengesetzte Transkriptionsrichtung aufweist, und dem ersten gemeinsamen Exon der anderen drei Gene betrug nur 80 bp. Dies läßt vermuten, daß diese 80 bp einen bidirektionalen Promotor enthalten.
- Bei *hs6M1-16* wurden Exons auch für die 3' UTR nachgewiesen.
- Bei einigen OR Genen wurden auch Sequenzen aus der kodierenden Region herausgespleißt, was zu stark verkürzten Proteinen führen könnte.
- Bei einigen Genen wurden an definierten Positionen vorzeitige Polyadenylierungen in der kodierenden Region gefunden.

Mehrere dieser Ergebnisse deuten auf eine komplexe Genregulation der HLA-gekoppelten OR Gene hin. Zusammen mit zahlreichen Genen, die nicht in allen Individuen funktionell sind, und zahlreichen weniger starken Variationen in der kodierenden Region, ergibt sich eine unerwartet große Komplexität bei der Expression HLA-gekoppelter ORs. Diese könnte dazu beitragen, daß Individuen individuelle Geruchspräferenzen entwickeln.

Summary

Olfactory receptors (OR) belong to the large family of proteins with seven transmembrane (TM) domains. They detect extracellular ligands according to their specificity, resulting in signal transduction into the cell lumen. There are hints that HLA-linked OR are involved in the perception of individual-specific body odours, resulting in odour dependent preferences for potential mating partners. It was shown for rodents that products of the major histocompatibility complex (MHC) influence the individual-specific body odour, and it is possible, that the configuration of the human MHC, the HLA-complex, can be smelled also by humans. To support this hypothesis, specific OR-haplotypes should be linked to specific HLA-haplotypes. This was analysed by testing a total of 13 potential functional genes and 9 OR pseudogenes in ten different HLA-homozygous or –hemizygous cell lines. All analysed genes with open reading frame (ORF) were polymorphic. Silent mutations as well as conservative and non conservative amino acid substitutions were found in all OR domains, with exception of EC4 and TM7. The analysis of the ten cell lines and the 13 HLA-linked OR genes with ORF led to at least 13 different OR haplotypes, which could be the basis for individual odour preferences.

Three of the analysed genes show in some cell lines intact alleles and in other cell lines non

functional alleles. Individuals, who are homozygous for such an intact allele, could show symptoms of a specific anosmia. So far it is unknown, if amino acid substitutions influence the ligand specificity or the interaction with proteins of the signal transduction cascade, because no specific ligands could be identified so far.

OR are not only present in the olfactory epithelium, but also in other organs. The expression of six OR genes in 50 tissues was tested with a Northern blot. Two of the tested genes show a specific expression only in three specific organs, whereas the other four genes are present in numerous organs. Some organs transcribe only specific HLA-linked OR genes and others a broader spectrum. The analysis of three cDNA libraries from testis, lung and kidney has shown, that in testis 13 of 14 analysed HLA-linked OR genes are transcribed, in contrast to lung and kidney with only 4 or 5, respectively.

To get hints about the promoter region of HLA-linked OR genes, the genomic structure of several OR genes was characterised. The 3' and 5' ends of some OR transcripts in testis, kidney and lung were detected with RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Several results were obtained, some of which were novel for G-protein coupled receptors:

- only five of these genes show additional 5' non coding exons
- three of these genes (*hs6M1-21*, *-27* and *-18*) show one common first 5' non coding exon; which is located, e.g. in the case of *hs6M1-21*, ~110 kb upstream of the start codon
- the distance between the first 5' exon of *hs6M1-16*, which is located centromeric of these three genes and exhibits an opposite transcription direction, and the first common exon of the neighbouring three genes (*hs6M1-21*, *-27* and *-18*) is only 80 bp. Therefore, it is tempting to speculate that these 80 bp contain a bidirectional promoter
- *hs6M1-16* exhibits exons in the 3' UTR
- some of the genes show splicing within the coding region, probably leading to truncated proteins
- some of the genes show premature polyadenylation within the coding region

Some of these results indicate a complex gene regulation of HLA-linked OR genes. Together with several genes, which are functional in only some individuals, and numerous conservative and non conservative variations in the coding region, an unexpected complexity was found with respect to the HLA-linked ORs, which could explain individual odour preferences.