

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie

Biologie

BBI



Petr Klempt

Evoluce olfaktorických receptorů

Evolution of Olfactory Receptors

Bakalářská práce

Školitel: doc. Mgr. Pavel Stopka Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 19. 8. 2011

Podpis

Za pomoc s touto prací velmi děkuji svému školiteli docentu Pavlu Stopkovi.
Poděkování za příspěví ke kvalitě práce patří také Romaně Stopkové, Štěpánu Rybovi, Janu
Suchanovi, Davidu Vinklerovi, Kateřině Janotové a Heleně Uhlířové.
V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině za velkou podporu v průběhu akademického
roku 2010 / 2011.

OBSAH

Abstrakt	str. 6
Úvod	str. 7
Literární rešerše	str. 8
1. Historie, obecné informace o molekulách ORs a jejich lokalizaci	str. 8
1.1. ORs mají 7 transmembránových α -helikálních domén	str. 8
1.2. ORs patří mezi GPCRs	str. 9
1.3. Olfaktorické receptory se nachází na cíliích OSNs	str. 9
1.4. Ektopická exprese olfaktorických receptorů	str. 9
2. Signální transdukce olfaktorických receptorů obratlovců	str.10
2.1. Vazba odorantu	str.11
2.1.1. Svět modelování	str.11
2.1.2. Man et al. 2004	str.11
2.1.3. Receptorový kód	str.11
2.2. Signalizační kaskáda	str.12
2.2.1. Obecný přehled	str.12
2.2.2. Struktura OR a její role v procesech předání signálu	str.12
2.2.2.1. Extracelulární N-terminální doména	str.13
2.2.2.2. Intracelulární C-terminální doména	str.14
2.2.2.3. Třetí intracelulární smyčka	str.14
2.2.3. Síla elementární odpovědi receptoru	str.15
2.2.4. Ric-8B, guanine nucleotide exchange factor	str.15
2.2.5. Adenylát cykláza typu III	str.16
2.2.6. CNG kanál, Bestrophin-2 a membránová depolarizace	str.16
2.2.7. Existují další cesty?	str.16
2.3. Návrat do stavu steady-state: desensitizace	str.17
2.3.1. Fosforylace proteinů	str.17
2.3.2. Odpověď CNG kanálu a ACIII na Ca^{2+}	str.18
3. Evoluce ORs	str.19
3.1. Klasifikace genů pro ORs	str.19
3.2. Nomenklatura	str.20
3.3. Struktura genu pro OR	str.20
3.4. Geny pro olfaktorické receptory jsou v klastrech...	str.21

3.5.	Geny pro OR jsou v strunatcích a hlavně v obratlovcích	str.21
3.5.1.	Původ ORs sahá daleko do minulosti	str.22
3.5.2.	ORs kopinatců a urochordata	str.22
3.5.3.	ORs mihulí a <i>Callorhinchus milii</i> (chondrichthyes)	str.23
3.5.4.	Ryby (Osteichthyes)	str.24
3.5.5.	Obojživelníci	str.25
3.5.6.	Plazi a ptáci	str.25
3.5.7.	Savci	str.27
3.5.7.1.	Ptakořitní	str.27
3.5.7.2.	Vačnatci	str.28
3.5.7.3.	Placentálové	str.28
Závěr		str.32
Seznam použité literatury		str.33

Abstrakt

Tato bakalářská práce pojednává o největší genové rodině savců, která kóduje olfaktorické receptory. Olfaktorické receptory náleží do podrodiny rhodopsin-like GPCRs, staré 600 až 800 milionů let. Minimálně od této doby hrají olfaktorické receptory, součást jednoho z nejstarších smyslů (čich), zásadní roli v detekci chemických látek ať už ve vodě, nebo ve vzduchu. Ohromný repertoár olfaktorických receptorů a jeho změny v průběhu evoluce u důležitých taxonů živočichů je v práci zmapován s důrazem na množství a podíl funkčních a nefunkčních genů pro olfaktorické receptory. Tyto hodnoty jsou totiž jedním z kritérií hodnocení olfaktorických schopností zvířat. Olfaktorické receptory jsou umístěny typicky na povrchu sensorického neuronu čichového epitelu, kde váží různé odoranty a spouští signalizační kaskádu vedoucí k depolarizaci membrány neuronu. Přibližně polovina práce proto shrnuje poznatky o molekulární biologii olfaktorických receptorů, jako je jejich struktura, zásadní složky signalizační kaskády (G α olf, ACIII, CNG kanál, Ca²⁺ dependentní Cl⁻ kanál), stejně jako složky potřebné k návratu do stavu steady-state. Určitá úroveň exprese olfaktorických receptorů ve velkém množství non-olfaktorických tkání (svaly, sperma, mozek atd.) ukazuje na možné důležité biomedicínské role těchto receptorů.

Klíčová slova: olfaktorické receptory, GPCR, evoluce, čich, receptorový kód

Abstract

This bachelor thesis deals with the largest gene family of mammals which encode olfactory receptors. Olfactory receptors fall in rhodopsin-like GPCRs subfamily, approximately 600 - 800 millions of years old. At least from this time, olfactory receptors play, as a part of one of the oldest senses (smell), fundamental role in detection of chemical cues from water or air. This work summarizes large repertoire of olfactory receptors and its changes during the evolution of important animal taxons with emphasis on number and fraction of functional and nonfunctional olfactory receptor genes. Those values are part of criteria used for olfactory ability of animals. Olfactory receptors are typically placed on surface of sensory neuron placed in olfactory epithelium, where they bind various odorants and triggers signal cascade which leads to neuron's membrane depolarization. Therefore, about one half of this work summarizes knowledge of olfactory receptor's molecular biology like their structure, main parts of signal cascade (G α olf, ACIII, CNG channel, Ca²⁺ dependent Cl⁻ channel) just as parts needed for steady-state establishment. Expression of olfactory receptors detected in amount of non-olfactory tissues (mussels, sperm, brain etc.), indicate possibly important biomedical roles of this receptors.

Key words: olfactory receptors, GPCR, evolution, sense of smell, receptor code

Úvod

Olfaktorické receptory jsou největší genovou rodinou savců, nacházíme je ale i v řadě linií obratlovců (Nei et al. 2008). Tyto receptory náleží do rhodopsin-like rodiny GPCRs (receptorů spřažených s G-proteiny), která vznikla v genomech živočichů před 600 - 800 miliony let (Römppler et al. 2007). Samotné olfaktorické receptory ale nachází svůj původ někde u předka žahavců a bilaterálních živočichů (Niimura 2009; Churcher & Taylor 2011). Prvním cílem práce je shrnutí znalostí o množství genů pro olfaktorické receptory (dále OR geny) tak, aby byla zachycena představa o stavu genových rodin, podrodin a množství genů olfaktorických receptorů u všech hlavních taxonů živočichů. Práce se tedy nezaobírá jemnými rozdíly v počtech OR genů. Ty jsou často výsledkem odlišných nastavení parametrů pro řazení přerušovaných sekvencí do konečného počtu funkčních a nefunkčních genů nebo použitou verzí sekvence genomu. Zejména u savců je těchto jemných rozdílů opravdu dost, což je způsobeno jednak zařazením řady druhů do celogenomových sekvenovacích programů, jednak množstvím OR genů dosahujících ~1500. Na druhou stranu, u celé řady zástupců uvádím počty genů získaných ze vzorku tkáně, PCR a degenerovaných primerů, které se od výsledků přesnějšího hledání OR genů v sekvencích mohou lišit.

Rozsahem asi poloviční část práce je věnována problému předání signálu tvořeného olfaktorickým receptorem v okamžiku zachycení odorantu. Opět, není v mých silách zachytit v daném rozsahu práce poznatky o všech složkách kaskád, snažil jsem se proto vybrat hlavní proteiny nutné pro přenos signálu. Těmi jsou většinou běžné komponenty signální transdukce, pouze specifické pro olfaktorický senzorický neuron. Jedná se o adenylát cyklázu, cyclickými nucleotidy otevíraný kanál, protein Ric-8B a významnou roli mají i proteiny desenzitizace. Velký význam má objev receptorového kódu (Kajiya et al. 2001), který přináší vysvětlení detekce množství odorantů řádově převyšujícího počet OR genů i těch nejbohatších obratlovců. Co však jsou ony odoranty? Jsou to chemické látky, které aktivují olfaktorický receptor, následně olfaktorický senzorický neuron a indikují tak vnímání pachu. Molekulární hmotnost odorantů je asi 300 a méně; může se jednat o produkty metabolismu, anorganické látky (SO₂, některé kovy atd.) (Touhara & Vosshall 2009). Pro naprostou většinu olfaktorických receptorů neznáme ani jeden z jeho odorantů a tento fakt naštěstí „kazí“ několik studií (například Spehr et al. 2003; Fukuda 2004).

Pod pojmem „olfaktorické receptory“ jsou v této práci představovány olfaktorické receptory obratlovcího typu. Práce nepojednává o olf. receptorech hmyzu, které nejsou příbuzné a mají převrácenou membránovou topologii (Touhara & Vosshall 2009).

Literární rešerše

1. Historie, obecné informace o molekulách ORs a jejich lokalizaci

Roku 1991 byl v časopise Cell publikován článek o objevení nové multigenové rodiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCRs): rodiny olfaktorických receptorů, nalézáných v membráně buněk olfaktorického epitelu potkana (Buck & Axel 1991). Autoři tak významně přispěli k charakterizaci prvního článku predikovaného řetězce předání chemického signálu zachyceného v čichovém epitelu na cílích OSNs do hlavního čichového bulbu a dále do vyšších mozkových center. Roku 2004 byli za tento objev vyznamenáni Nobelovou cenou (The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2004) (Miller 2004).

1.1. ORs mají 7 transmembránových α -helikálních domén

Olfaktorické (dále ORs pro *pl.*, OR pro *sg.*) receptory mají, stejně jako ostatní GPCRs (Strader et al. 1989), sedm transmembránových helikálních domén (Strader et al. 1989; Buck & Axel 1991). Transmembránové domény olfaktorických receptorů jsou složeny z 19-26 aminokyselin a obsahují úseky maximální sekvenční podobnosti ostatním GPCRs (Buck & Axel 1991). Protein leží v membráně tak, že N-terminální doména a tři ze smyček spojujících transmembránové domény ústí do extracelulárního prostoru, C-terminální doména a zbylé tři smyčky do prostoru intracelulárního (Buck & Axel 1991). N-terminální doména obsahuje glykosylační místo, C-terminální doména cysteinový zbytek (L. Buck & Axel 1991). Ten zřejmě slouží jako místo pro palmitoylaci (Buck & Axel 1991), což je reversibilní postranslační modifikace proteinu hydrofóbní kyselinou palmitovou ($C_{15}H_{35}COOH$) (více o palmitoylaci např. Dietrich & Ungermann 2004). C-terminální doména je takto ukotvena k membráně (Buck & Axel 1991). Konzervované cysteiny nalezneme i v sekvenci první a druhé extracelulární smyčky, kde zřejmě formují disulfidickou vazbu (Buck & Axel 1991). Potud jmenované vlastnosti byly společné pro ORs obecně. Transmembránové oblasti TM3, TM4 a TM5 se však od sebe v aminokyselinovém složení mezi jednotlivými zástupci multigenové rodiny ORs velmi liší, což by mohlo napovídat o potenciální roli těchto 3 domén v selektivní vazbě ligandů (Buck & Axel 1991). Změny složení těchto domén by zapříčinily vazbu jiného ligandu, jiné změny zas vazbu dalšího ligandu atd. Takto lze vysvětlit ohromnou divergenci ORs zejména v těchto doménách: TM3, TM4 a TM5 (Buck & Axel 1991).

1.2. ORs patří mezi GPCRs

ORs jsou GPCRs. GPCRs se dělí na základě sekvenční podobnosti do pěti rodin a ORs jsou řazeny do Rhodopsin-like rodiny (Fredriksson & Schiöth 2005). S přihlédnutím k poznatkům získaným z jiných GPCRs (Kobilka et al. 1988), charakterizovali Axel a Bucková (1991) třetí intracelulární smyčku jako možné místo vazby G-proteinu. Ve stejném duchu, analogicky k ostatním GPCRs, vysvětlili několik konzervovaných serinů a threoninů v třetí intracelulární smyčce jako možné místo fosforylace kinázami zapojenými v procesu desensitizace (Buck & Axel 1991).

1.3. Olfaktorické receptory se nachází na cílích OSNs

Olfaktorické sensorické neurony (dále OSNs) jsou pomyslnou výkonnou složkou olfaktorického systému. Olfaktorický systém savců je rozdělen na několik částí, které jsou anatomicky i funkčně rozdílné. Jedná se o hlavní čichový epitel (MOE), vomeronasální orgán (VNO), septální orgán (SO) a Grünebergovo ganglium (GG) (Munger et al. 2009). Každý z těchto kompartmentů má své specifické populace OSNs, které se liší morfologií OSNs, expresí chemosenzorických receptorů (spolu s příslušnými proteiny signální transdukce) a konečně i axonální projekcí do odlišných částí hlavního, případně přídavného olfaktorického sensorického bulbu. Tato část předního mozku je primárním místem zpracování informací, které jsou dále předávány do vyšších olfaktorických center (Munger et al. 2009). Lokalizace uvedených orgánů a projekce do částí olfaktorického sensorického bulbu je znázorněna na obrázku 1.

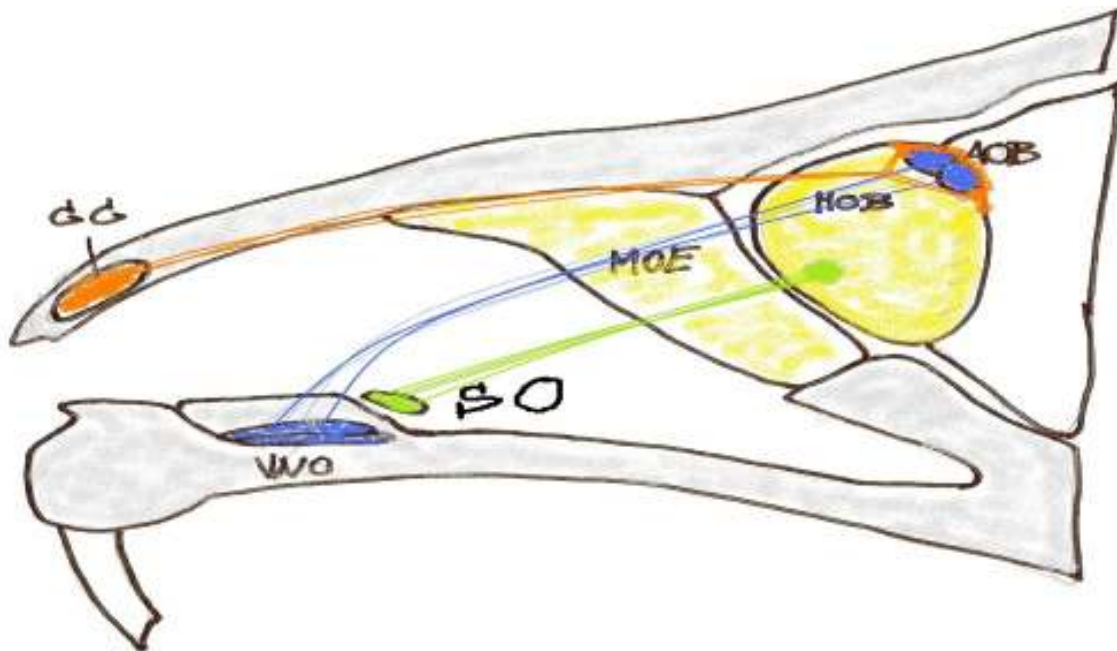
Olfaktorické receptory se nachází typicky na površích OSNs hlavního čichového epitelu. Na povrchu každého OSN je vystaven pouze jeden typ olfaktorického receptoru („One neuron-one receptor rule“) (první zmínka v Malnic et al. 1999; Imai & Sakano 2009). OSNs, které expresují stejný olfaktorický receptor vysílají své axony do stejného místa v olfaktorickém bulbu (Imai & Sakano 2009). Řada studií ukazuje, že ORs hrají v obou zmíněných fenoménech zásadní roli (Imai & Sakano 2009).

1.4. Ektopická exprese olfaktorických receptorů

Olfaktorické receptory jsou expresovány v olfaktorických tkáních (MOE, olfaktorický bulbus atd.), avšak nejen tam. Pro tento případ exprese ORs v jiných než olfaktorických tkáních, mluvíme o ektopické expresi. Ta byla potvrzena ve spermiích, varlatech, jazyku, placentě, střevech, játrech a v dalších tkáních (Spehr et al. 2006). Analýza expresních dat

velkého množství tkání ukázala, že každá prozkoumaná tkáň expresovala alespoň jeden OR (Feldmesser et al. 2006). Jak Feldmesser et al. (2006) upozornili, alespoň část ektopické exprese ORs nemusí mít žádný funkční význam a je selektivně neutrální.

Výše uvedené tvrzení však jistě nebude záležitostí myšího olfaktorického receptoru 23 (MOR-23) a jeho exprese ve svalové tkáni, kde se účastní regeneračních procesů (Griffin et al. 2009). Důležitá role je přikládána i hOR17-4, olfaktorickému receptoru přítomnému na lidských spermích (Spehr et al. 2003).



Obrázek 1 – Mediální řez modelovou lebku se znázorněnými orgány olfaktorického systému a jejich projekcí do hlavního čichového bulbu (MOB) nebo přídavných čichových bulbů (AOB). GG – Grünebergovo ganglium, SO – septální orgán, VNO- vomeronasální orgán, MOE- hlavní čichový epitel. Podle Munger et al. (2009), upraveno.

2. Signální transdukce olfaktorických receptorů obratlovců

Procesem signální transdukce je míněna přeměna signálu obsaženého v molekule odorantu, který vazbou na odpovídající olfaktorický receptor aktivuje signalizační kaskády vedoucí k přeměně na signál elektrický, šířící se na membráně olfaktorického senzoryckého neuronu.

2.1. Vazba odorantu

2.1.1. Svět modelování

V hledání a predikci vazebného místa ORs jsme odkázáni na experimentálně zjištěné struktury dalších GPCRs, jelikož zatím nebyla experimentálně stanovena ani jedna struktura OR. Jak jsem již uvedl výše, jednotlivé ORs se v sekvenci transmembránových oblastí TM3, TM4 a TM5 od sebe velmi liší, což by mohlo napovídat o potenciální roli těchto 3 domén v selektivní vazbě ligandů (Buck & Axel 1991). Tuto možnost víceméně potvrzují i modely založené na porovnávání konzervovaných aminokyselinových pozic v sekvenci receptorů mezi orthologními a paralogními páry (Pilpel & Lancet 1999; Lapidot et al. 2001; Kondo et al. 2002; Man et al. 2004). Předpoklad je, že mezi páry paralogních receptorů bude sekvenční variabilita podstatně vyšší než u orthologních párů, které by mohly vázat podobný nebo stejný ligand. Porovnáním sekvenčních variabilit párů orthologů a párů paralogů můžeme získat aminokyseliny intragující s ligandy (velmi zjednodušeně). Tento předpoklad studie splňují (Pilpel & Lancet 1999; Lapidot et al. 2001; Kondo et al. 2002; Man et al. 2004).

2.1.2. Man et al. 2004

K vazbě odorantu pravděpodobně dochází v tzv. vazebné kapse (*angl.* binding pocket), místě tvořeném transmembránovými doménami olfaktorického receptoru TM2 až TM7 a druhou extracelulární smyčkou (Man et al. 2004). Autoři studie našli potencionální ligand-vazebná místa, jimiž mělo být 22 konzervovaných aminokyselin v sekvencích transmembránových domén (TM2 až TM7) a v 2. extracelulární smyčce (Man et al. 2004). Při homologním modelování OR, založeného na rentgenové struktuře hovězího rhodopsinu, se 20 konzervovaných aminokyselin „shluklo“ na straně transmembránových domén formujících vazebnou kapsu modelu OR (Man et al. 2004). Zbylé dvě konzervované aminokyseliny leží na druhé extracelulární smyčce, která je tlačena disulfidickou vazbou směrem k vazebné kapse a tvoří k ní protilehlý vazebný prvek (Man et al. 2004).

Nutno dodat, že se model celkem dobře shoduje s modely dalších autorů, kdy hlavní část konzervovaných aminokyselin byla mezi transmembránovými doménami TM3 až TM7 (Floriano et al. 2000; Singer 2000; Reisert & Restrepo 2009).

2.1.3. Receptorový kód

Odorant je vázán několika, pro něj unikátními ORs a jeden OR váže několik odorantů (Malnic et al. 1999; Kajiya et al. 2001). Existují jak receptory vážící velké množství odorantů

(tzv. generalist nebo také „broadly tuned receptors“), tak receptory s úzkým vazebným profilem (tzv. specialist nebo „narrowly tuned receptors“) (Touhara & Vosshall 2009). Strukturně příbuzné druhy ORs mají překrývající se vazebné afinity a specifity pro stejné odoranty (Kajiya et al. 2001). Druhy odorantových receptorů tak mají svůj unikátní vazebný rozsah (*angl.* receptive range), který specifikuje vázané odoranty kombinací aktivovaných receptorů, resp. OSNs (Malnic et al. 1999; Kajiya et al. 2001).

Odorant nemusí být jen agonistou (jeho vazba aktivuje OR a cesty signální transdukce), může být i antagonistou (Oka et al. 2004). Takový odorant je schopen inhibovat odpověď receptoru na vazbu jiného odorantu (Oka et al. 2004).

Uvedené informace dohromady dávají představu o jakémisi receptorovém kódu, unikátního pro každý odorant, který se navíc s koncentrací odorantu mění (Kajiya et al. 2001). Ohromné množství potencionálních ligandů početností v řádech převyšuje počty druhů ORs třeba i mezi takovými specialisty, jako je potkan a myš (str. 29,30). Receptorový kód tak vysvětluje, jak řádově menší množství různých ORs může detekovat obří množství ligandů (Malnic et al. 1999). V samotné vazbě odorantu ve vazebné kapse hrají roli hlavně vodíkové můstky spolu s hydrofóbními a van der Waals interakcemi, které stačí na to, aby OR rozpoznal velikost, tvar a funkční skupinu odorantu (Katada et al. 2005). Bez zajímavosti snad není poznatek, že jediná změna v konzervované aminokyselině OR může změnit působení odorantu jako agonisty na antagonistu (Katada et al. 2005). Kombinace uvedených informací o receptorovém kódu spolu s poznatky o antagonismu odorantů by mohla vysvětlit fenomén, kdy naše vnímání směsi odorantů neodpovídá součtu jednotlivých složek směsi (Laing 1989 podle Oka et al. 2004), ale může být vnímáno jako jiná, ve směsi nepřítomná složka (Oka et al. 2004).

2.2. Signalizační kaskáda

2.2.1. Obecný přehled

Předpokládaný hlavní molekulární mechanismus kaskády vedoucí od aktivovaného OR k depolarizaci membrány OSN byl uveden již v publikaci objevitelů rodiny ORs (Buck & Axel 1991). Vazba odorantu na receptor (*angl.* coupling) vytváří komplex odorant-receptor, který aktivuje G-protein $G_{\alpha olf}$. Aktivace $G_{\alpha olf}$ je doprovázena zvýšením intracelulární koncentrace cAMP v důsledku činnosti adenylát cyklázy typu III (ACIII), aktivované právě $G_{\alpha olf}$. Díky zvýšené hladině cAMP dochází k otevírání cyklickými nukleotidy otevíraných kanálů (dále CNG kanál), které následně propouští kationty Ca^{2+} z extracelulárního prostoru dovnitř buňky a tak dochází k depolarizaci membrány senzorického neuronu. Amplifikace

depolarizace membrány OSN je uskutečněna aktivací chloridových kanálů na membráně pomocí Ca^{2+} , vedoucí k průchodu Cl^- přes membránu ven z buňky (Ronnott & Moon 2002; Touhara & Vosshall 2009).

Uvedené děje jsou probrány níže detailněji, včetně různých rolí domén OR, dalších cest aktivace signalizace a nakonec celého procesu desenzitizace, vedoucího k návratu OR do stavu steady-state, připraveného pro příjem dalšího odorantu.

2.2.2. Struktura OR a její role v procesech předání signálu

Struktura olfaktorického receptoru hraje klíčovou roli jak při přenosu signálu, tak při procesech vedoucích k samotné expresi receptoru na membránu. Vycházíme však z výsledků získaných pouze pro několik málo členů (např. mOR-EG, MOR-23) jinak obrovské rodiny olfaktorických GPCR, které jsou dané problémy s expresí ORs v heterologním expresním systému (Gimelbrant et al. 1999). Možným důvodem tohoto problému je absence proteinů specificky zapojených do úprav, zaujetí správné konformace či transportu olfaktorických receptorů v nechemosenzorických buňkách použitých pro studium těchto receptorů. ORs se následně hromadí v lumen endoplasmatického retikula a ve své cestě na membránu nepokračují (Astvatsaturov et al. 1997). Důkazem této možnosti je inducibilní chaperon Hsp70, specifický pro buňky olfaktorické sliznice, nalezený po vystavení teplotnímu a/nebo chemickému šoku (Simpson et al. 2004, 2005). Koexprese Hsc70t, konstitutivního chaperonu původně nalezeného v spermatidách (Ito et al. 1998), spolu s ORs v HEK293 vykazovala výrazné zvýšení exprese receptorů a zvýšení množství buněk s funkčními ORs na jejich membránách (Neuhaus et al. 2006).

2.2.2.1. Extracelulární N-terminální doména

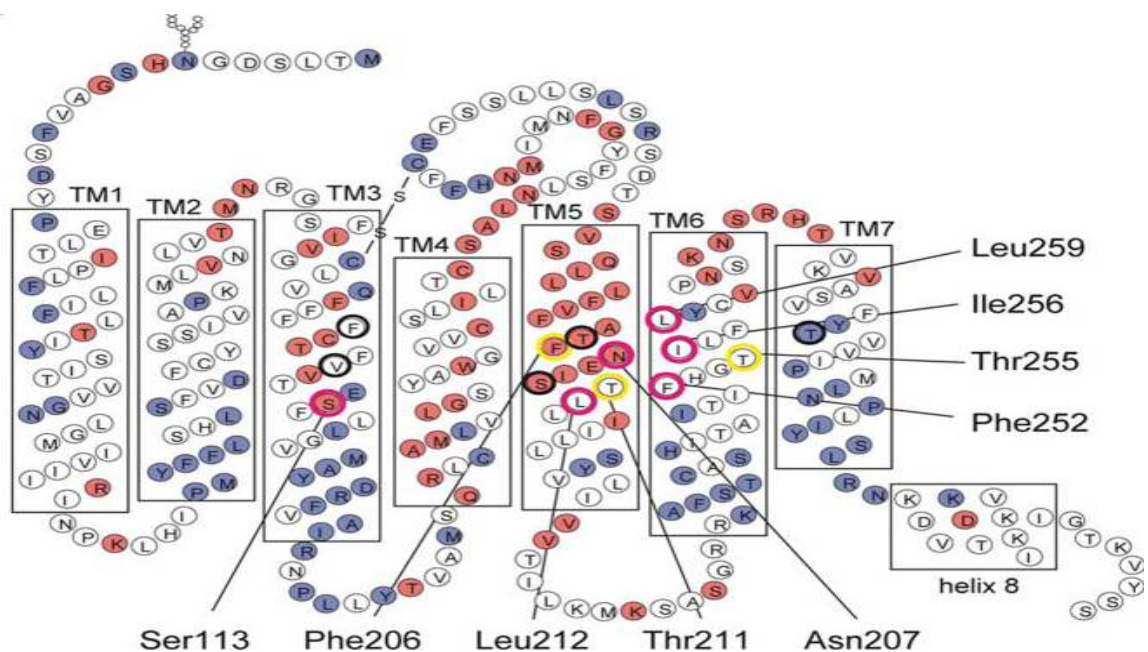
Extracelulární N-terminální doména olfaktorického receptoru se pravděpodobně účastní jak procesů translokace proteinu do membrány, tak dopravení k plasmatické membráně. Pro tyto procesy je naprosto zásadní glykosylace N-terminálního glykosylačního místa s konzervovanou (v rámci ORs) aminokyselinovou sekvencí. Po odstranění této sekvence či záměně aminokyseliny (Asn7 za Asp7) nedochází totiž k žádné odpovědi zaznamatelné na úrovni Ca^{2+} nebo cAMP. Naopak experimentální přivěšení další N-terminální glykosylační sekvence k proteinu OR vedlo sice ke zvýšenému transportu na membránu a expresi proteinu, nicméně prakticky neovlivnilo hladiny Ca^{2+} a cAMP (Katada et al. 2004).

2.2.2.2. Intracelulární C-terminální doména

ORs se spřahují s G-proteiny (např. G α olf) (Kajiya et al. 2001). V procesu vazby G α olf na OR zastává významnou roli intracelulární C-terminální doména spolu s třetí intracelulární smyčkou receptoru. Experimentální zkrácení C-terminální domény mOR-EG o 10 aminokyselin nebo přivěšení epitopu na C-terminální doménu se projeví v ztrátě odpovědi receptoru na odorant, nicméně na expresi receptoru vliv nemá (Katada et al. 2004). C-koncová doména zřejmě tvoří intracelulární helikální mikrodoménu, osmý helix proteinu (viz. obrázek 2) s konzervovanými aminokyselinovými zbytky v rámci ORs (Lys 296, Lys299, Lys303), která se účastní a zaručuje správné interakce a selektivitu při párování s G-proteiny (G α olf) (Kato et al. 2008). Mutace v těchto lysinových zbytcích měly efekt na odpověď receptoru po stimulaci ligandem (měření dle hladin cAMP a Ca $^{2+}$), nicméně určitá malá odpověď (v Ca $^{2+}$) byla pozorována (Kato et al. 2008).

2.2.2.3. Třetí intracelulární smyčka

Evolučně konzervované úseky se 70% identitou v rámci rodiny ORs nalezneme i u třetí intracelulární smyčky OR. Jde o aminokyseliny Gly234, Leu227, Ser231 a Ile222, kdy poslední tři jmenované zřejmě interagují s G α olf. Ser231 se pak, v rámci ORs vysoce konzervované sekvence KAFSTC, účastní regulace přechodu konformace receptoru z inaktivní na aktivní (Kato et al. 2008).



Obrázek 2 – Model mOR-EG. Červeně jsou znázorněna variabilní místa, modře konzervovaná místa. Převzato z Kato et al. (2008).

2.2.3. Síla elementární odpovědi receptoru

Pro aktivaci OR stačí zřejmě jen jeden odorant (Bhandawat et al. 2005). Vazba odorantu na OR trvá jen velmi krátkou dobu, za kterou receptor pravděpodobně aktivuje maximálně jeden G α olf (Bhandawat et al. 2005). Tento aktivovaný G-protein by navíc mohl aktivovat pouze jedinou adenylát kinázu (Sunahara et al. 1997). Všechny tyto poznatky vedou k možnosti, že odpověď na vytvoření komplexu odorant-receptor je, ve srovnání s elementární odpovědí fotoreceptoru, extrémně malá a dochází jen k minimální signální amplifikaci (Bhandawat et al. 2005). V kontextu chemicko-fyzikální podstaty odorantů, paradigmatu dnešní evoluční biologie a za předpokladu šíření a ředění odorantů v prostředí, bych však toto vnímal v pozitivním smyslu - jako adaptaci na odfiltrování zbytečných, klamavých signálů, kdy až určité koncentrace odorantu vyvolávají smysluplnou (tedy i dostatečně silnou) odpověď.

2.2.4. Ric-8B, guanine nucleotide exchange factor

OR po vazbě odorantu na membráně OSN aktivuje podjednotku trimerického G-proteinu G α olf (Touhara & Vosshall 2009). Aktivovaný receptor ale pravděpodobně může aktivovat maximálně jeden G-protein (Bhandawat et al. 2005) (viz kapitola Síla elementární odpovědi receptoru). Je však možné, že k zaručení aktivace alespoň jednoho G-proteinu (resp. podjednotky G α olf) přispívají přídavné proteiny, specifické pro olfaktorické tkáně, jako je protein Ric-8B (Von Dannecker et al. 2005). Ric-8B byl popsán jako člen velké a diversifikované rodiny GEF (guanine nucleotide exchange factors) proteinů, který se váže na podjednotky G α s a G α q (Tall et al. 2003). GEF proteiny obecně urychlují tvorbu aktivní formy G α (schopné aktivace různých efektorů, např. ACIII) tím, že se váží na neaktivní komplex G α – GDP a GDP odstraní (Sprang 2001).

Role Ric-8B jako GEF a tedy i důležité komponenty procesu signální transdukce je podpořena několika výzkumy. V heterologním systému HEK293 aktivovaný G α olf aktivuje ACIII a ta zvýší cytosolickou koncentraci cAMP. Pokud je však s G α olf přítomen Ric-8B, koncentrace cAMP je vyšší (Von Dannecker et al. 2005). *In situ* hybridizační experimenty ukázaly, že Ric-8B je, stejně jako G α olf, specificky exprimován v zralém OSN (Von Dannecker et al. 2005). Imunofluorescenční experimenty dále ukázaly, že G α olf a Ric-8B kolokalizují na periférii buňky (Von Dannecker et al. 2006). Koexprese G α olf a Ric-8B navíc vykazala dvakrát silnější periferní lokalizaci G α olf v porovnání se samotnou expresí G α olf (Von Dannecker et al. 2006). Tyto výzkumy, spolu s důkazy přímé interakce G α olf a Ric-8B

(Von Dannecker et al. 2005), preferenční vazby Ric-8B na komplex G α olf–GDP spíše než na komplex G α olf-GTP (Kerr et al. 2008), podporují roli Ric-8B jako významného regulátoru signální transdukce odorantu (Kerr et al. 2008).

Ric-8B však neváže pouze G α olf, ale i další G α podjednotky trimerických G-proteinů (Tall et al. 2003; Kerr et al. 2008). *In vitro* biochemické studie vlivu Ric-8B na Gas neprokázaly funkci Ric-8B jako GEF, nicméně jako pozitivního regulátoru signální transdukce ano (Nagai et al. 2010).

2.2.5. Adenylát cykláza typu III

Adenylát cykláza je jedním z enzymů, které významně přispěli k poznání celé signální kaskády aktivované odorantem a to zejména díky tvorbě detekovatelného cAMP a značnému množství tohoto enzymu v OSNs (Pace et al. 1985; Sklar et al. 1986). Konkrétně se jedná o adenylát cyklázu typu III, specifickou pro ciliie OSNs, která je aktivována G α olf (Bakalyar & Reed 1990). V ciliích OSNs lze nalézt další typy adenylát cykláz (ACII a ACIV), které by se hypoteticky přenosu signálu také mohly účastnit, nicméně pouze myši s nefunkční ACIII nevykazují žádnou odpověď na odoranty a navíc vykazují změny v chování (Wong et al. 2000).

2.2.6. CNG kanál, Bestrophin-2 a membránová depolarizace

Jak napovídá název CNG (Cyclic Nucleotide Gated) kanálu, umístěného v membránách cilií OSNs, jde o proteinový komplex otevíraný zvýšením cytosolické koncentrace cAMP (Nakamura & Gold 1987). Otevřením kanálu mohou do cilií pronikat kationty Ca²⁺ a Na⁺, které následně způsobí počáteční elektrickou odpověď na vazbu odorantu (Matthews & Reisert 2003). Zvýšená hladina cytosolického Ca²⁺ otevře Ca²⁺-závislé Cl⁻ kanály, Cl⁻ ionty jsou transportovány přes Cl⁻ kanály z cilií do extracelulárního prostoru a přispějí tak k zesílení depolarizace (Matthews & Reisert 2003).

Myší bestrophin-2 (mBest-2), by mohl být oním Ca²⁺ dependentním Cl⁻ kanálem, nebo spíše jeho částí (Qu et al. 2004; Pifferi et al. 2006). Jeho role, stejně jako poznatky o expresi v různých tkáních či absence projevu na fenotypu u myši po knockoutu bestrophinu-2, není však zdaleka vyjasněna (Kunzelmann et al. 2009).

2.2.7. Existují další cesty?

Pro výše uváděnou cestu signální amplifikace existuje poměrně silná podpora na poli deficientních fenotypů způsobených knockoutem jejích genů. Například absence proteinů

Goolf, kdy mutantní fenotyp vykazuje výrazně sníženou odpověď OSNs na různé odoranty, behaviorální změny adultních myší a i v jejich důsledku vysokou úmrtnost mláďat (více jak 75% během 2 dnů) (Belluscio et al. 1998). Další podporou je na elektroolfaktogramu nedetekovatelná odpověď na cAMP u myší s knockoutovaným genem pro CNG kanál (Brunet et al. 1996) stejně, jako u myší s knockoutovaným genem pro ACIII (Wong et al. 2000).

Existuje však i další cesta signální transdukce? Pravděpodobně ano, předpokládané jsou 2 cesty signální transdukce odlišné od výše uváděných. Jedná se o jednu o cestu zahrnující membránově vázanou guanylyl cyklázu a fosfodiesterázu typu 2, jednak o cestu transdukce přes fosfolipázu C a TRPM5 kanál (Touhara & Vosshall 2009). Pro zaměření práce však tyto alternativní cesty podrobněji neuvádím.

2.3. Návrat do stavu steady-state: desensitizace

V procesu desensitizace dochází k návratu všech aktivovaných komponentů signální kaskády do stavu steady-state, tedy k přípravě pro novou aktivaci další molekulou odorantu (Touhara & Vosshall 2009; Ronnett & Moon 2002). OSNs tohoto na úrovni ORs pravděpodobně dosahují několika procesy: fosforylací aktivovaných ORs, jejich internalizací a také odpojením (*angl.* uncoupling) ORs od G-proteinů (Ronnett & Moon 2002). Na rozdíl od jiných GPCRs toho však o cestách a proteinech zúčastňujících se odorantem-aktivované desensitizace ORs víme velmi málo (Mashukova et al. 2006).

2.3.1. Fosforylace proteinů

Fosforylace proteinů účastnících se olfaktorických signálních kaskád je pokládána za významnou součást terminace odpovědi na vazbu odorantu (součásti procesu desensitizace), vyvolané zvýšenou koncentrací cAMP (jde tedy o zpětnou negativní vazbu) díky zachycení odorantu OR a následné aktivaci signální kaskády (Boekhoff et al. 1992). Experimentálně bylo zjištěno, že díky působení specifických inhibitorů protein kinázy A (PKC), nebo protein kinázy C (PKC) byla kompletně zablokována fosforylace proteinů umístěných v ciliích OSNs (Boekhoff et al. 1992). V desensitizaci ORs pomocí fosforylace proteinů je pravděpodobně významně zapojena i G-protein-coupled receptorová kináza 3 (GRK3) (Peppel et al. 1997), označovaná také jako β -adrenergní receptorová kinasa-2 (β ARK2), preferenčně exprimovaná v olfaktorickém epitelu (Schleicher et al. 1993). Zdá se, že GRK3 není aktivovaná zvýšenou hladinou cAMP, na rozdíl od PKA a PKC (Schleicher et al. 1993).

Předpokládané role cAMP-dependentních protein kináz v procesu desensitizace jsou následující: PKC zastavuje IP_3 kaskádu (jedna z alternativních cest signální transdukce), PKA

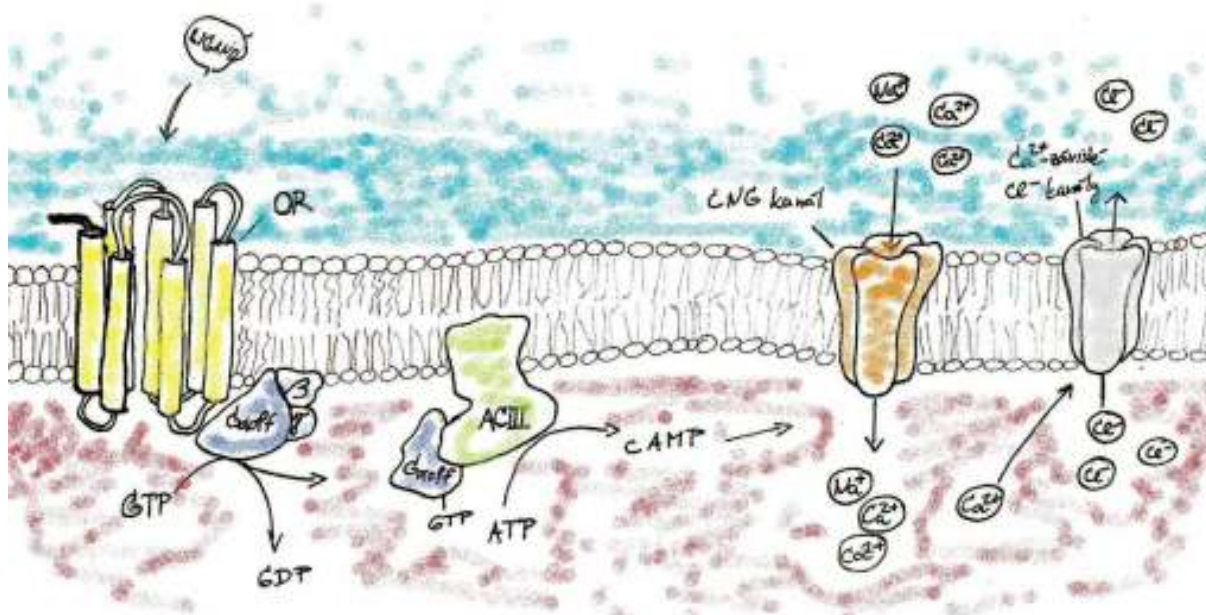
vypíná procesy vedoucí ke zvýšené cytosolické hladině cAMP (Boekhoff & Breer 1992). PKA by také mohla hrát roli ve fosforylaci serinových a threoninových zbytků třetí intracelulární smyčky aktivovaných ORs, která je zřejmě nezbytná pro vazbu β -arrestinu2 na receptor (Mashukova et al. 2006). Vazba β -arrestinu2 na aktivovaný OR indukuje internalizaci tohoto komplexu do recyklujícího endosomu přes clathrin-dependentní endocytózu, která je součástí desensitizace (Mashukova et al. 2006).

GRK3 by mohla být přímo zapojena v procesu odpojení (*angl.* uncoupling) OR od G-proteinu (Lefkowitz & Caron 1993 podle Peppel et al. 1997). Přímá fosforylace aktivovaného ORs (pravděpodobně C-terminální domény) specifickou kinásou (snad právě GRK3) by mohla vést k zamezení další aktivace G-proteinů a aktivovaného OR (Ronnott & Moon 2002).

Existují však i názory, že arestiny a fosforylace proteinů hrají roli pouze v procesech dlouhodobé odpovědi na detekci odorantu (více o této odpovědi v Ronnett & Moon 2002), zatímco při standardní terminaci olfaktorické odpovědi na velmi krátkodobý vznik komplexu odorant-receptor je jejich účast nepravděpodobná (Bhandawat et al. 2005).

2.3.2. Odpověď CNG kanálu a ACIII na Ca^{2+}

Velkou roli bude hrát jistě i negativní zpětná vazba na zvýšenou cytosolickou koncentraci Ca^{2+} (Touhara & Vosshall 2009). Zvýšená koncentrace Ca^{2+} jednak stabilizuje uzavřenou konformaci CNG kanálů (Zufall et al. 1991), jednak aktivuje CaMKII, která fosforyluje ACIII a tak ji deaktivuje (Wei et al. 1998).



Obrázek 3- Zobrazení některých dějů následujících po vazbě ligandu na olfaktorický receptor. Podjednotka Golf a ACIII jsou na vnitřní, cytosolické straně membrány. Nakresleno podle Munger et al. (2009), upraveno.

3. Evoluce ORs

3.1. Klasifikace genů pro OR

ORs jsou klasifikovány do 9 skupin α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , κ (Niimura & Nei 2005b) a λ (Niimura 2009). Každá z těchto skupin měla v posledním společném předku (ve smyslu Most Recent Common Ancestor, zkr. MRCA) ryb a tetrapodů alespoň 1 gen pro OR (Niimura & Nei 2005b). U ryb bylo nalezeno 8 z těchto 9 skupin, skupina α u ryb chybí (Niimura & Nei 2005b). Naopak, skupina ζ je specifická pouze pro ryby (Niimura & Nei 2005b). Jediného zástupce ORs u ryb (resp. u *Danio rerio*) má skupina γ (Niimura & Nei 2005b). Skupiny δ , ϵ , ζ a η jsou u ryb největšími skupinami (Niimura & Nei 2005b).

Žáby mají také zástupce ORs z osmi skupin (chybí ζ). Skupina γ je u žab (*Xenopus tropicalis*) daleko větší (370 funkčních genů, 802 včetně pseudogenů), což je více jak 90% ze všech ORs (Niimura & Nei 2005b)! Podobnou procentuální převahu (blízko 90%) skupiny γ lze nalézt u kuřete (*Gallus gallus domesticus*), myši (*Mus*) a člověka. Druhou nejdůležitější, minimálně z pohledu počtu genů, je u tetrapod skupina α . Ta spolu se skupinou γ směrem od žab k savcům a ptákům ohromně expandovala. U savců a ptáků jsou s převahou největší skupiny γ a α . U ptáků a člověka byl nalezen jeden funkční gen pro θ , alespoň jeden gen ze skupiny κ a 3 geny skupiny β byly pozorovány u myši (Niimura & Nei 2006).

Přihlédneme-li k životnímu prostředí uváděných zvířat (*Danio rerio*, *X. tropicalis*, *G. gallus*, *Mus musculus*) a k způsobu, jakým je využívají, lze logicky vyvodit následující závěry. Ve vodním prostředí se uplatňují zejména skupiny δ , ϵ , ζ , η pravděpodobně protože váží odoranty rozpustné ve vodě (Niimura & Nei 2005b). Skupiny α a prakticky i γ (mnohařádově větší počet zástupců, než u ryb) jsou nalézány jen u živočichů alespoň částečně žijících na souši, schopných dýchat vzdušný kyslík a proto jsou považovány za receptory vzduchem se šířících odorantů (Niimura & Nei 2005b).

O výše uvedeném rozdělení vypovídá i odlišná exprese ORs v nosní dutině u *Xenopus laevis* (Freitag et al. 1995). Párová nosní dutina žab je rozdělena na 3 subsystémy: VNO a dvě části hlavní komory, mediální diverticulum a laterální diverticulum (Altner 1962 podle Freitag et al. 1995). Pokud je tato žába na hladině, kožní „klapka“ uzavírá laterální diverticulum, zatímco mediální diverticulum je otevřené a žába tak může vnímat pachy ze vzduchu pomocí sensorického epitelu s ORs třídy II („mammals-like“ ORs) (Freitag et al. 1995). Ponoří – li se pod hladinu, vstup na mediální diverticulum je uzavřen kožní „klapkou“, vodě je vystaveno laterální diverticulum, kde zachytávání ve vodě rozpuštěných

odorantů zprostředkují ORs třídy I („fish-like“ ORs) (Freitag et al. 1995). Rozdělení nosních dutin na dva odlišně specializované sensorické epitely v mediálním a laterálním diverticulu představuje adaptaci na život ve vodě a zároveň i v terestrickém prostředí (Freitag et al. 1995).

Rozdělení olfaktorických receptorů na „fish-like“ receptory (třída I) a „mammals-like“ receptory (třída II) (Freitag et al. 1995; Glusman et al. 2000) je dnes překonané. Třída I by měla obsahovat jen receptory ryb a odpovídající část receptorů obojživelníků (Freitag et al. 1995). Nicméně toto rozdělení v reálu příliš neplatí (Niimura & Nei 2006). Označení třída I (geny skupin α a β) a třída II (geny skupiny γ) proto patří dnes genovým skupinám tetrapod, specializovaným na detekci odorantů ve vzduchu, zejména tedy savcům (Niimura & Nei 2006; Nei et al. 2008). Je proto dobré vnímat tyto dvě odlišné pojetí třídy I a II v závislosti na citovaných publikacích či době vydání publikace.

Existuje ještě další rozdělení ORs. Skupiny α , β , γ , δ , ϵ , ζ jako geny typu 1 (kam patří i geny ORs mihulí) a skupiny η , θ , κ a λ jako geny typu 2, u kterých neznáme funkci a je i možné, že přes jistou míru podobnosti s ORs ani jako ORs nefungují (Niimura & Nei 2005b; Niimura 2009).

3.2. Nomenklatura

Systém pojmenovávání genů olfaktorických receptorů je založený na klasifikaci rodiny a podrodiny receptoru (Glusman et al. 2000). OR1D2 znamená, že jde o olfaktorický receptor rodiny 1 (OR1D2), podrodiny D (OR1D2) a číslo za písmenem podrodiny je individuální genové číslo receptoru v rámci podrodiny (OR1D2). Pokud je za pětiznakovým jménem receptoru písmeno „P“ (např. OR1D2P), jde o pseudogen. Rodiny třídy II jsou označovány číslicemi 1 až 50, rodiny třídy I číslicemi počínaje 51 dále. Pokud se jedná o receptor myši, je místo OR uvedeno *Or* (Glusman et al. 2000).

3.3. Struktura genu pro OR

Geny pro ORs neobsahují, v typickém případě (narážím na různé předpokládané geny pro ORs u starších linií, než jsou chordata, kapitola 3.5.1.) žádné introny v kódující oblasti (Fleischer et al. 2009). Krátké exony a introny však nalezneme v nekódujících regionech před i za kódujícím úsekem. Zaznamenaný alternativní sestřih exonů před místem stratu translace nedává vzniku nových proteinů (Fleischer et al. 2009). Místo startu transkripce a polyadenylační signál jsou umístěny do vzdálenosti 1-10 kb od kódujícího regionu (Fleischer et al. 2009).

3.4. Geny pro olfaktorické receptory jsou v klastrech vytvářených tandemovou duplikací

Studie lidského a myšního genomu ukázaly, že geny pro ORs se nalézají ve valné většině v genomických klastrech (klastrech genů se specifickou genomickou lokací), rozmístěných na všech chromosomech vyjma chromosomů 20 a Y u člověka (Glusman et al. 2001; Niimura & Nei 2003). Rozmístění genů na chromosomech myši už tak jasné v publikacích není. Opět, široká distribuce genů na většině chromosomů sice platí (X. Zhang & Firestein 2002; Godfrey et al. 2004; Niimura & Nei 2005a), nicméně udávané chromosomy bez genů pro ORs jsou v uvedených publikacích jiné. Niimura & Nei (2005a), udávají chromosom 18 a Y jako jediné bez ORs.

Průměrný klastř ORs v lidském genomu obsahuje ~300kb a asi 90% klastřů je velikostně mezi 100kb a 1Mb (Glusman et al. 2001). Na chromosomech 1, 6, 9, 11, 14 a 19 je rozmístěno 73% genů (funkčních i pseudogenů) pro ORs, zatímco zbylých 23% je rozmístěno na zbylých chromosomech (na chromosomu 22 je jen 1 gen pro OR) (Glusman et al. 2001). Analýzy rozdělily geny pro ORs člověka do 2 tříd („fish-like“ třída 1 a „mammals-like“ třída 2; kapitola 3.1.) a ty dále do několika rodin a subrodin (Glusman et al. 2001; Niimura & Nei 2003). Srovnání míry příbuznosti genů a jejich lokace v klastrech ukázalo, že funkční geny stejné fylogenetické linie si jsou často blízko lokací na chromosomu a mnohdy mají stejný směr transkripce (Niimura & Nei 2003). Takové geny vznikly pravděpodobně tandemovou genovou duplikací (Niimura & Nei 2003). V důsledku chromosomálních přestaveb a translokací však v jednom klastru můžeme často nalézt i geny dvou a více různých fylogenetických linií olfaktorických receptorů (Niimura & Nei 2003). Studium klastřů nám může povědět mnoho například o historii duplikací a chromosomálních přestaveb, či dalších osudech duplikovaných úseků jako nového základu pro další speciaci (Glusman, Yanai, et al. 2001; Niimura & Nei 2003; Niimura & Nei 2005; Zhang & Firestein 2002; Godfrey et al. 2004).

3.5. Geny pro OR jsou v strunatcích a hlavně v obratlovcích

V této kapitole se pokusím přehledně uvést dostupné informace o počtech ORs v genomech strunatců a obratlovců. Nejprve však začnu u linií starších, než jsou předešlé zmíněné.

3.5.1. Původ ORs sahá daleko do minulosti

Olfaktorické receptory tvoří největší multigenovou rodinu u savců, přítomné jsou u všech obratlovců, včetně mihulí *Lampetra fluviatilis* (Berghard & Dryer 1998; Freitag et al. 1999) a *Petromyzon marinus* (Libants et al. 2009). Gouki Satoh (2005) navíc našel u kopinatce (*Branchiostoma belcheri*), jednoho z nejbližších příbuzných obratlovců, gen pro GPCRs, který má podobnost s obratlovcími ORs a experimentálně zjistil expresi tohoto genu na bipolárních neuronech v rostrálním epitelu dospělých kopinatců. Je však možné vystopovat původ olfaktorických receptorů ještě dále? Zdá se, že ano. Olfaktorické receptory jsou součástí rhodopsin-like rodiny GPCRs, stejně jako opsiny (Fredriksson & Schiöth 2005; <http://www.gpcr.org/7tm/>), které byly nalezeny v genomu *Trichoplax adherenes* (Srivastava et al. 2008). *Amphimedon queenslandica*, živočišná houba žijící na Velkém bariérovém útesu, obsahuje v genomu již rozsáhlé expanze rhodopsin-like family genů (Srivastava et al. 2010). S přihlédnutím k přibližnému času divergence kmene Porifera od ostatních metazoa kolem 600 milionů let, lze předpokládat vznik této rodiny rhodopsin-like GPCRs v rozmezí 600-800 milionů let (Römpler et al. 2007).

Původ ORs strunatců se snažili objasnit Churcher & Taylor (2011) pomocí hledání společných aminokyselinových motivů z ORs bezlebečných a obratlovců v predikovaných proteinech non-chordat (živočichové mimo strunatce; strunatci - chordata). Nalezli 35 plnohodnotných a 11 částečných sekvencí OR-like genů u druhu *Nematostella vectensis* (Anthozoa, Cnidaria) (Churcher & Taylor 2011). Většina těchto genů (35 z celkových 41) byla, stejně jako ORs obratlovců, kódována jedním exonem a uspořádána v tandemových sekvencích (Churcher & Taylor 2011). Sedmadvacet OR-like genů, opět v genomu většinou tandemově seřazených a jedním exonem kódovaných, našli u *Strongylocentrotus purpuratus* (Echinodermata) (Churcher & Taylor 2011). Nalezené OR-like geny *S. purpuratus*, *N. vectensis* a geny ORs strunatců vychází z jedné monofyletické linie a je tedy možné, že ORs strunatců mají svůj původ u předka žahavců (Cnidaria) a oboustranně souměrných živočichů (Bilateria) (Churcher & Taylor 2011). K podobnému závěru dochází i Niimura (2009).

3.5.2. ORs kopinatců a urochordata

V genomu kopinatce *Branchiostoma belcheri* (Cephalochordata) byl nalezen gen sice se slabou sekvenční identitou k ORs obratlovců (ale také k dalším zástupcům Rhodopsin-like rodiny), nicméně sdílel motivy a konzervované aminokyselinové zbytky společné obratlovcím

ORs (Satoh 2005). Navíc, tento případný OR gen byl bez intronů, kódoval TM domény a byl lokalizován v bipolárních neuronech v rostrálním epitelu (Satoh 2005). I u dalšího zástupce kopinatců, *Branchiostoma floridae*, byly nalezeny geny příbuzné k OR obratlovců. Jednak se jedná o 31 potencionálně funkčních genů, vzniklých genovou expanzí až v linii kopinatců (Niimura 2009), jednak o 61(34 kódovaných jedním exonem) případných genů pro ORs (Churcher & Taylor 2009). Identifikované geny včetně genu z *B.belcheri* (Satoh 2005) tvoří monofyletickou linii se všemi geny pro ORs obratlovců (Niimura 2009) a je možné že se začaly vyvíjet před ~550 miliony lety, po oddělení podkmene Cephalochordata od strunatců (Churcher & Taylor 2009).

Studie autorů uvedených v předchozím odstavci se zabývaly také hledáním orthologů ORs v genomech podkmene Urochordata. Ani u zástupců třídy Ascidiacea (*Ciona intestinalis* a *C. savignyi*), ani u zástupce *Oikopleura dionica* (Appendicularia) však nebyly nalezeny žádné geny pro ORs a zdá se, že ztráta ORs se udála už ve společném předku jmenovaných tříd Urochordata (Satoh 2005; Churcher & Taylor 2009; Niimura 2009).

3.5.3. ORs mihulí a *Callorhinchus milii* (chondrichthyes)

Způsob života mihulí klade značné nároky na jejich olfaktorický systém a to ve všech stádiích života. *Petromyzon marinus* (mihule mořská, Agnatha) ve svém genomu obsahuje 27 intaktních OR genů a 35 OR pseudogenů (Libants et al. 2009). Tato mihule během životního cyklu prochází třemi stádii (stádium larvy, parazitické stádium a dospělec), které se poměrně zásadně liší z hlediska morfologie, fyziologie i způsobem obživy (Gaisler & Zima 2007). To by mohlo být důvodem rozdílné exprese některých chemosensorických genů (včetně ORs) v různých stádiích života (Libants et al. 2009).

Další studie, tentokrát ORs mihule říční (*Lampetra fluviatilis*, Agnatha), ukázala přítomnost 4 genů pro ORs v genomu a *in situ* hybridizace olfaktorických receptorů potvrdila jejich expresi v chemosenzorických buňkách olfaktorického orgánu (Freitag et al. 1999).

Oba zmíněné druhy mihulí (*Petromyzon marinus* a *Lampetra fluviatilis*), spolu s dalšími 12 druhy non-chordat, zařadil do své fylogenetické analýzy Niimura (2009). Došel k závěru, že divergence olfaktorických receptorů na dva typy genů (geny typu 1 a geny typu 2) musela předcházet divergenci bezčelistnatých (Agnatha) od čelistnatých (Gnathostomata), protože geny ORs mihulí spadají jak do genů typu 1, tak do genů typu 2 (Niimura 2009). Geny ORs z mihulí však nespádají do žádné skupiny genů typu 1 ($\alpha - \zeta$) a namísto toho v rámci genů typu 1 tvoří 2 skupiny genů lamp -a a lamp -b (Niimura 2009). V případě genů typu 2 je situace jiná, když se geny ORs mihulí rozpadají do skupin η , κ a λ (Niimura 2009).

K divergenci genů typu 2 na skupiny η , θ , κ a λ tak zřejmě došlo dříve, než k divergenci mezi čelistatci a bezčelistnatci (Niimura 2009).

Stále ještě ne plně pokrytý genom *Callorhinchus milii* (podtřída Holocephali, třída Chondrichthyes) vykázal jen šest genů, z nichž jen 3 jsou plnohodnotné, resp. (potencionálně) funkční (Niimura 2009). Jeden (přerušovaný) OR gen v analýze spadl do skupiny lamp-a genů typu 1, intaktní OR gen do skupiny η , 2 přerušované a 1 funkční geny do skupiny θ a konečně 1 funkční gen do skupiny κ (Niimura 2009). Ze znalosti divergence genů typu 1 u kostnatých ryb na skupiny $\alpha - \zeta$ a z poznatků získaných z genomů mihulí a *C. milii* lze vyvodit, že divergence genů typu 1 se odehrála až po divergenci chrupavčitých ryb (Chondrichthyes) a ryb kostnatých (Teleostei) (Niimura 2009).

3.5.4. Ryby (Osteichthyes)

Kostnaté ryby (Teleostei) rozhodně nepatří co do počtu ORs k přeborníkům, jako je potkan (obecně udávané množství ORs u ryb je asi 100, potkan cca 15x více), nicméně i tak jsou schopny detekovat ve vodním prostředí řadu odorantů, jako jsou žlučové kyseliny, aminokyseliny, nukleotidy, prostaglandiny a steroidy (Hino et al. 2009). Zatímco valná většina savčích receptorů spadá do dvou skupin (α a γ), olfaktorické receptory ryb náleží do skupin osmi, což ukazuje na větší diversifikaci genů pro ORs u ryb (Niimura & Nei 2005b). Ryby nemají žádný gen skupiny α , prakticky nemají ani geny skupiny γ (jen jeden intaktní gen v genomu *Danio rerio*, pseudogeny u *Oryzas latipes* a *Gasterosteus aculeatus*; Niimura 2009). Rybí receptory však spadají zejména do skupin δ , ϵ , ζ a η , které jsou považovány za receptory pro odoranty rozpustné ve vodě (Niimura & Nei 2005b). Přítomné jsou u ryb i geny skupiny β , jež jsou nalézány i v suchozemských obratlovcích a snad detekují jak hydrofilní, tak hydrofóbní odoranty (Niimura 2009). Přibližně jeden funkční gen v genomu ryb mají zbývající skupiny (θ , κ a λ).

Rozdíl v počtu ORs u různých druhů ryb se poměrně zásadně liší (více jak u savců), když v genomu *Danio rerio* bylo nalezeno 143 intaktních genů a v genomu *Tetraodon nigroviridis* 42 intaktních genů (Alioto & Ngai 2005), resp. 154 u *D. rerio* a 11 u *T. nigroviridis* (Niimura 2009).

Menší počet ORs v rybích genomech neznamená nutně menší důležitost olfaktorického systému ve vodním prostředí. Zajímavým příkladem schopnosti olfaktorického systému u ryb je jistě migrace lososů, kteří jsou díky tzv. olfaktorickému imprintingu (vnímání odorantů během migrace z místa narození dále po proudu řeky a konečně až do oceánu), schopni přesného návratu z oceánu do jejich „rodného“ potoka, kde se poté vytírají

(Hino et al. 2009). Nutno přiznat, že není jasné, zda za tento jev jsou zodpovědné také olfaktorické receptory. Účast olfaktorického systému a receptorových buněk olfaktorického epitelu je však pravděpodobná (Hino et al. 2009).

Zástupce jedné z nejpříbuznějších sesterských skupin tetrapod *Latimeria chalumnae* (Sarcopterygii) ve svém genomu obsahuje jak třídu I („fish-like“ receptors), ale oproti kostnatým rybám (Teleostei) i třídu II („mammals-like“ receptors) olfaktorických receptorů (obě třídy zde brány v pojetí Freitag et al. 1995) (Freitag et al. 1998). Třída II v *Latimerii* vykazuje 64% pseudogenizaci a je otázkou, zda vůbec jsou předpokládané funkční geny třídy II někde na těle exprimovány (Freitag et al. 1998). Ať již jsou nebo ne, přítomnost obou tříd v genomu latimerie ukazuje, (společně s výše popsány poznatky o třídách receptorů ryb, obojživelníků a savců) na vývoj třídy II z předka třídy I (Freitag et al. 1998).

3.5.5. Obojživelníci

Obojživelníci mají pro výzkum ORs velký význam, jde totiž o první tetrapoda alespoň částečně žijící na souši. Třídám ORs, které byly popsány na základě repertoáru ORs u *Xenopus laevis* (Freitag et al. 1995) a rozdělení párové nosní dutiny (anatomické, funkční i co do exprese tříd ORs) u *Xenopus laevis* jsem se věnoval v kapitole 3.1. Zatímco Niimura & Nei (2005b) identifikovali v draft sekvenci genomu *Xenopus tropicalis* 888 genů pro ORs (součet funkčních genů, částečných sekvencí a pseudogenů), Niimura (2009) již uvádí celkových 1638 genů pro OR (!) v plně sekvenovaném genomu. Celkovým počtem genů se tak *Xenopus tropicalis* řadí k nejbohatším organismům, počtem funkčních ORs (824) překonává celou řadu savců (Niimura 2009). Genom *X. tropicalis* obsahuje již 8 funkčních genů skupiny α , oproti kostnatým rybám (Teleostei) však neobsahuje žádný gen pro skupinu ζ (Niimura 2009). Pozoruhodné jsou počty genů skupiny γ (752 funkčních, 190 částečných sekvencí, 590 pseudogenů) a skupiny β (14 funkčních, 8 pseudogenů) (Niimura 2009), které potvrzují zmíněné hypotézy (kapitola 3.1) o zaměření skupin receptorů na hydrofóbní či hydrofilní prostředí (nebo na obě v případě skupiny β , kapitola 3.5.4.).

3.5.6. Plazi a ptáci

Teprve relativně nedávné sekvenování genomu prvního plaza, anolise rudokrkého (*Anolis carolinensis*, Reptilia), umožnilo zjistit počet ORs v jeho draft genomové sekvenci a srovnáním s počty ORs u různých druhů ptáků získat informaci o evoluci repertoáru ORs v rámci třídy Sauropsida. Niimura (2009) našel 112 funkčních (146 celkově), Steiger et al. (2009) 110 funkčních (156 celkově) OR genů. V draft verzi genomu anolise obě studie

nalezly 1 funkční gen skupiny α , 111 resp. 108 funkčních genů skupiny γ a 1 funkční gen skupiny θ (Niimura 2009; Steiger et al. 2009).

Ptáci jsou obecně považováni za vizuálně a sluchově orientovaní. Relativně nedávné výzkumy stavu OR genů v genomech ptáků (Steiger et al. 2009; Niimura 2009) však potvrzují důležitou roli čichu i u řádu jakým jsou pěvci (Passeriformes), schopní takto například detekovat predátora (Amo et al. 2008 a reference tam uvedené). Genomy kura domácího (*Gallus gallus*, řád Galliformes) a zebřičky pestré (*Taenopygia guttata*, řád Passeriformes) odhalily větší repertoár ORs, než byl ten u *A. carolinensis*. Genom kura domácího obsahuje 479, zebřičky pestré 553 OR genů (celkový počet genů). Ovšem frakcí intaktních OR genů (~72 %) převyšuje anolis oba ptačí zástupce (~66 % kur, ~38 % zebřička) (Steiger et al. 2009). Za vyšší počet OR genů v ptačích genomech je zřejmě zodpovědná hlavně expanze jedné větve genové skupiny γ (tzv. γ -c), která nemá v genomu anolise žádné zástupce a je tedy považována za specifickou pro ptáky, nikoliv pro sauropsidní linii (Steiger et al. 2009). Podobně jako níže popisovaná podrodina u mořských hadů, γ -c podrodina prodělala u obou linií vedoucích k druhům *Gallus gallus* i *Taenopygia guttata* na sobě nezávislé expanze prostřednictvím genových duplikací (Steiger et al. 2009). Velký význam podrodiny γ -c lze potvrdit i z hlediska jejího procentuálního příspěví na celkovém počtu intaktních OR genů, který je 77 % u kuřete a 96 % u zebřičky (Steiger et al. 2009).

Hadi (Serpentes) obecně silně závisí na vnímání okolí pomocí detekce volatilních chemikálií (Shivik 1998; Byerly et al. 2010). Velice zajímavé výsledky přináší studie srovnávající repertoár ORs hadů čeledi Elapidae (Kishida & Hikida 2010). Jedná se o srovnání 2 podčeledí, které se sekundárně, nezávisle na sobě adaptovaly na mořské prostředí a liší se požadavkem na terestrické prostředí v době kladení vajec. Zatímco živorodí mořští hadi podčeledi Hydrophiinae k množení terestrické prostředí nepotřebují, oviparní mořští hadi podčeledi Laticaudinae terestrické prostředí ke kladení vajec potřebují. Předpokladem je, že zatímco u Laticaudinae bude poměr pseudogenizace ORs (v důsledku jejich uplatnění v terestrickém prostředí) zhruba odpovídat terestrickým druhům, u podčeledi Hydrophiinae bude, díky ztrátě funkce ORs (vyvinutých k detekci volatilních odorantů) ve vodě, poměr pseudogenizace větší (Kishida & Hikida 2010). Výsledky studie předpoklad potvrzují a nacházejí paralelu u dalších, sekundárně na vodu adaptovaných živočichů. Na základě PCR amplifikace DNA z tkání hadů pomocí OR-specifických degenerovaných primerů byl poměr pseudogenizace u Hydrophiinae asi 30 %, u Laticaudinae 10 % a u terestrických zástupců Elapidae asi 7 % (Kishida & Hikida 2010). Další možnou paralelou, tentokrát s ptáky a jejich

γ -c, je přítomnost tzv. „Colubridea- specific“ OR podrodiny, která spadá stejně jako valná většina zkoumaných genů do skupiny γ (třída I) a obsahuje zhruba 15 % všech OR genů (Kishida & Hikida 2010). V rámci zkoumaných podčeledí tato specifická podrodina genů ORs neobsahuje žádné pseudogeny, což naznačuje její možné uplatnění v mořském i terestrickém prostředí (Kishida & Hikida 2010). Zjištěných 14 genových duplikací před divergencí Hydrophiinae a Laticaudinae a dalších, alespoň pět nedávných genových duplikací v rámci druhů podčeledi Hydrophiinae ukazuje na rapidní evoluci této podrodiny v procesu adaptace na mořské prostředí (Kishida & Hikida 2010).

S dodatkem lze jako podporu adaptace skupin γ a α (částečně i β) na detekci volatilních odorantů brát i studii genů ORs želvy *Caretta caretta* (čeleď Cheloniidae) (Kishida et al. 2007). Jde o sekundárně na mořské prostředí adaptovaného živočicha, který potřebuje (obdobně jako hadi podčeledi Laticaudinae) pobřeží pro kladení vajec (Gaisler & Zima 2007). Podíl pseudogenů je 31 %, avšak ten je tvořen pouhými čtyřmi pseudogeny, devět OR genů je intaktních (Kishida et al. 2007). Pro srovnání, hadi podčeledí Laticaudinae a Hydrophiinae měli celkem 20 OR genů (dva pseudogeny), resp. 53 OR genů (16 pseudogenů) (Kishida & Hikida 2010). Genomová sekvence *Anolis carolinensis* vykázala asi 150 OR genů, z nichž asi 110 bylo funkčních (Niimura 2009; Steiger et al. 2009).

3.5.7. Savci

Jak jsem uvedl v kapitole 3.1., v rámci třídy savců se často udává počet OR genů spadajících do třídy I a II, kdy třída I odpovídá skupinám α a β , třída II skupině γ .

3.5.7.1. Ptakořitní

Celkový počet OR genů přesahující 700 u ptakopyska podivného (*Ornithorhynchus anatinus*) z jeho draft genomové sekvence stanovily dvě studie (Niimura & Nei 2007; Warren et al. 2008). Niimura & Nei (2007) uvedli 51,5% podíl pseudogenů (350 funkčních genů a přerušovaných sekvencí, 370 pseudogenů), který prakticky odpovídá podílu pseudogenů v genomu člověka (kapitola 3.5.7.3., odstavec Primáti.). Do třídy II spadá 265 OR genů, 31 genů do třídy I (Niimura & Nei 2007). Velký podíl pseudogenizace je pravděpodobně částečně zapříčiněn semi-akvatickým způsobem života (Niimura & Nei 2007; Warren et al. 2008).

3.5.7.2. Vačnatci

Draft genomová sekvence vačice krysy (*Monodelphis domestica*) odhalila pouhý 20% podíl pseudogenů v repertoáru 1492 OR genů. Podílem i počtem funkčních OR genů (minimálně 1188) se vačice řadí k nejbohatším savcům, podobně jako potkan a myš (Niimura & Nei 2007). Při použití zásadně odlišné techniky stanovení počtů OR genů, došli k velmi vysokému počtu OR genů (1518) i Aloni et al. (2006).

3.5.7.3. Placentálové

Šelmy

Šelmy jsou ve studiích repertoáru olfaktorických receptorů napříč různými druhy nejčastěji zastupováni psem domácím (*Canis lupus f. familiaris*). Počet OR genů byl z draft genomové sekvence stanoven na 1100 OR genů, z nichž asi 811 OR (160 patří do třídy I, 651 do třídy II) genů je funkčních a podíl pseudogenů je asi 25 % (Niimura & Nei 2007; podobné výsledky uvádí také Kishida et al. 2007; Aloni et al. 2006). Odlišný podíl pseudogenů sice uvádí Zhang et al. (2011), nicméně se zdá, že u vlka (*Canis lupus*) bude ve srovnání se psem domácím podíl pseudogenů ještě nižší. Velmi zajímavé srovnání 109 OR genů ze 48 psů zastupujících 6 plemen přináší studie Stéphanie Robin et al. (2009). Objevují vysoký průměrný polymorfismus v exonech genů pro ORs, který se však mezi plemeny podstatně liší a navrhuje, že to by mohl být důvod rozdílných detekčních schopností různých plemen psů. Plemena využívaná složkami bezpečnosti a záchranářskými složkami i pro své výborné olfaktorické schopnosti, německý ovčácký pes a labrador, vykazovala nejvyšší míru polymorfismu, pekinézský pes naopak nejmenší (Robin et al. 2009). Jako zástupce řádu šelem žijícího semi-akvatickým způsobem života uvádím lachtana ušatého (*Eumetopias jubatus*), u kterého podíl pseudogenizace ORs dosáhl 37 % (Kishida et al. 2007). Ve srovnání s kytovci je podíl pseudogenizace poměrně malý, což indikuje využití ORs v době pobytu na souši.

Kytovci a sudokopytníci

Kytovci jsou pravděpodobně příbuznými suchozemských sudokopytníků a (dle fosilních nálezů) existovali jistě již ve svrchním eocénu (Gaisler & Zima 2007). Kráva (*Bos taurus*) je naprostým vítězem srovnání repertoáru OR genů, jelikož její genom obsahuje 2129 OR genů, z nichž téměř polovina jsou pseudogeny. 142 funkčních genů je třídy I, zbytek funkčních spadá do třídy II (Niimura & Nei 2007). Důvod takto vysokého počtu jak funkčních, tak nefunkčních OR genů není jasný. Úplně jiný případ však jsou kytovci, jejichž

podíl OR pseudogenů často nad 70 % svědčí o adaptaci OR receptorů na terestrické prostředí a odpovídá i značné redukci či absenci olfaktorických bulbů a odpovídajících nervů (Kishida et al. 2007; McGowen et al. 2008; Hayden et al. 2010).

Primáti

Příkladem toho, že nejen prostředí determinuje podíl pseudogenů (a ostatně i celkový počet OR genů) je Hypotéza upřednostnění barevného vidění (volný překlad z *angl.* colour vision priority hypothesis). Ta totiž velmi dobře vysvětluje velký podíl pseudogenizovaných ORs u primátů (člověka nevyjímaje). Gilad et al (2004) srovnáváním podílu pseudogenů ze souboru 100 náhodně zvolených OR genů u 19 druhů primátů zjistil velké rozdíly mezi druhy opic úzkonosých (Catarrhini, opice starého světa) a ploskonosých (Platyrrhini, opice nového světa). Zatímco opice úzkonosé měly velký podíl OR pseudogenů, opice nového světa výrazně menší (Gilad et al. 2004). Až na jednu výjimku, vřešťana černého (*Alouatta caraya*), který dosahoval srovnatelného podílu OR pseudogenů jako úzkonosé opice (Gilad et al. 2004). Rod *Alouatta* je totiž jediným ze zástupců ploskonosých opic, kde trichromatické vidění může být i u samců, stejně jako je tomu u opic úzkonosých (Jacobs et al. 1996). Gilad et al (2004) tuto shodu vysokého podílu OR pseudogenů u linií, které nezávisle na sobě vyvinuly trichromatické vidění, interpretují jako výsledek menších nároků na olfaktorický systém v důsledku využívání trichromatického vidění.

Gilad et al. (2004) svou studii založili na náhodně vybraných 100 ORs. Od této studie se však celogenomové sekvenování posunulo o značný kus dál k lepšímu pokrytí genomu, ale i k zařazení dalších genomů do sekvenovacích programů. Počet ORs člověka se udává na celkových 802 OR genů, 387 funkčních genů, 58 genů náleží do třídy I, podíl pseudogenů 51,7 % (Go & Niimura 2008). Velmi podobné výsledky byly zaznamenány pro šimpanze (*Pan troglodytes*), které se jak počtem OR genů, podílem pseudogenů, tak počtem genů třídy I a II téměř nelišily od člověka (Go & Niimura 2008). Ačkoliv se co do jmenovaných charakteristik oba genomy téměř neliší, repertoár ORs u člověka a šimpanze je, i přes přítomnost 288 funkčních OR genů v obou genomech, odlišný. 98 funkčních genů ORs člověka nemá orthologa mezi funkčními OR geny šimpanze, 94 funkčních OR genů šimpanze nenachází orthologní gen v repertoáru funkčních OR genů člověka (Go & Niimura 2008). Stejná studie uvádí i repertoár OR genů makaka (*Macaca mulatta*), který je se svými 606 celkovými, 309 funkčními OR geny (36 genů třídy I) a podílem pseudogenů (46 – 49%) o zhruba 25 % menší. Ve funkčních OR genech makaka a člověka bylo nalezeno 157 orthologních genů (Go & Niimura 2008). Malý podíl funkčních OR genů (312) byl nalezen i

u orangutana (*Pongo pygmaeus abelii*), jehož genom dále obsahuje 54% podíl OR pseudogenů (366) v celkovém počtu 687 OR genů (Dong et al. 2009). Kosman bělovousý (*Callithrix jacchus*) se zas počtem 383 funkčních OR genů vyrovnává člověku i šimpanzi, nikoliv tak podílem (okolo 40 %) a počtem OR pseudogenů (258) (Dong et al. 2009). S ohledem na 80% pokrytí genomu a tedy i velkého počtu přerušovaných sekvencí OR genů, byl stanoven počet 371 funkčních OR genů u poloopice munny myši (*Microcebus murinus*) (Dong et al. 2009).

Jak je patrné, v počtech OR genů mezi primáty nejsou velké rozdíly, což je v kontrastu s ostatními savci (uvedeni výše) (Dong et al. 2009). V složení repertoáru funkčních OR genů v jednotlivých zástupcích však rozdíly jsou, což je reprezentováno například větším počtem orthologů v dvojicích člověk-makak a člověk-kosman, než ve dvojici člověk-orangutan. Dong et al. (2009) proto docházejí k závěru, že repertoár ORs v jednotlivých druzích primátů prošel evolucí typu „Narodit se a zemřít“ (*angl.* birth-and-death evolution) (Nei & Rooney 2005), reprezentovanou získáním či (v tomto případě spíše) ztrátami genů pro ORs, a uvolněním selekčních tlaků na počet olfaktorických receptorů, kdy míra uvolnění byla nejvyšší u hominidů, nejmenší u ploskonosých opic (Dong et al. 2009).

Letouni

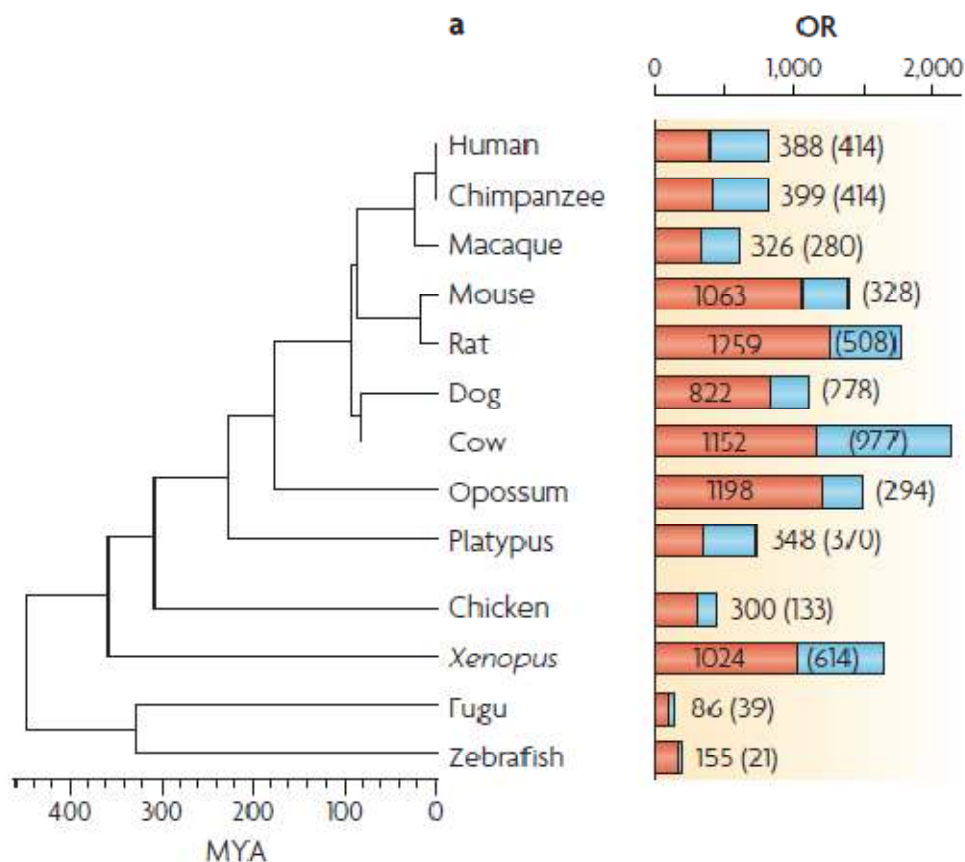
Navrhované trade-off mezi čichovým a zrakovým smyslem u primátů (Gilad et al. 2004) ukazuje na možnost obdobného trendu u netopýrů (řád Letouni). Ti využívají echolokačního smyslu k lovu i orientaci v prostoru (Gaisler & Zima 2007). Hypotézu upřednostnění echolokace (*angl.* echolocation-priority hypothesis) však Hayden et al. (2010) nepotvrzují s tím, že nenašli významné rozdíly v podílech pseudogenů mezi netopýry (využívajícími echolokaci) a kaloni (kteří echolokaci nevyužívají a také náleží do řádu letounů). Pro doplnění, genomy netopýra *Myotis lucifugus* a kaloně *Pteropus vampyrus* ukazují podobné počty OR genů (659 a 672) a podobný podíl pseudogenů (42 % a 49 %) (Hayden et al. 2010).

Hlodavci

Genom myši (*Mus musculus domesticus*) obsahuje asi 1035 funkčních OR genů a 328 pseudogenů, které odpovídají asi 23% části celkového počtu genů (1391) (Niimura & Nei 2005a; Niimura & Nei 2007). Srovnání téměř 3x většího repertoáru funkčních myších OR genů s repertoárem OR genů člověka ukazuje, že celkové složení obou repertoárů je velmi podobné (Zhang & Firestein 2002). Zdá se, že ačkoliv člověk nedosahuje takového množství

OR genů jako myš, na fylogenetickém stromě jejich OR genů mu nechybí žádná hlavní větev OR genů, která je přítomna u myši. Prakticky by toto mohlo znamenat, že člověk sice nemá tak výborné rozlišovací schopnosti různých odorantů jako myš (u které jsou dané jak mnohonásobnými duplikacemi genů, tak i vlivem anatomických a morfologických přizpůsobení), stále je ale schopen detekce stejného spektra odorantů (Zhang & Firestein 2002). Topologie fylogenetického stromu vytvořeného z myších a lidských OR genů ukazuje na to, že repertoár obou druhů byl tvořen evolucí „Narodit se a zemřít“ (Niimura & Nei 2005a).

Olfaktorický subgenom potkana (*Rattus norvegicus*) je co do počtu OR genů (1767), počtu funkčních OR genů (1207) i pseudogenů (508) větší než ten myší, větší je i podílem pseudogenů (~29 %) (Niimura & Nei 2007). Ve srovnání s OR geny psa se však zdá být méně polymorfní (pes má více podrodin OR genů) (Quignon et al. 2005). Je však otázkou, co rozdíl v počtech OR genů či počtech podrodin OR genů znamenají pro olfaktorické schopnosti zvířat (Quignon et al. 2005).



Obrázek 4 – Zobrazení podílu funkčních OR genů (červeně) a OR pseudogenů (modře) u linií obratlovců. Čísla uvedená mimo závorky označují počet funkčních genů, čísla v závorkách počet pseudogenů. Prerušené OR genové sekvence jsou počítány do funkčních genů. Převzato z Nei et al. 2008.

Závěr

Expanze rodin γ a α v genomech terestrických živočichů velmi dobře ukazuje na přizpůsobení k detekci odorantů ze vzduchu (Nei et al. 2008). To vysvětluje vysokou míru pseudogenizace v olfaktorickém subgenomu mořských savců, kteří se na toto prostředí adaptovali až sekundárně. V jejich genomech už nebyly geny kódující receptory vhodné pro detekci chemických látek rozpuštěných ve vodě. Ukazuje se však, že některé rodiny OR genů savců mohly tuto schopnost ve vodním prostředí získat, jelikož jejich proporční účast na olfaktorickém subgenomu mořských savců (33%) je vyšší, než u terestrických savců (17%) (Hayden et al. 2010). Stejně výsledky však mohou ukazovat na získání jiné funkce, než je ta čichová (Hayden et al. 2010). Vysoká míra pseudogenizace je již dlouho známa u primátů (Gilad et al. 2004). Přítomnost trichromatického vidění u druhů s vyšším podílem OR pseudogenů, než je tomu u druhů s mono- / di-chromatickým zrakem, nabízí lákavou Hypotézu upřednostnění barevného vidění (Gilad et al. 2004; Nei et al. 2008). Aplikace hypotézy na další druhy savců poměrně „sedí“, ačkoliv ne vždy (*Bos taurus* má také vysoký podíl OR pseudogenů, ale jen dichromatické vidění) (Nei et al. 2008). Její rozšíření na ptáky či obojživelníky však není možné (obě třídy mají výborné barevné vidění a zároveň poměrně nízké podíly pseudogenizace) (Nei et al. 2008). Odvozená Hypotéza upřednostnění echolokace nenachází rozhodující podporu v datech (Hayden et al. 2010). Jak však zmiňuje Nei et al. (2008), je otázkou, zda poměr OR pseudogenů je tím správným hodnotícím měřítkem (jsou selektivně neutrální). Sekvence nových genomů jistě přinesou odpověď.

Repertoár olfaktorických receptorů je zřejmě předmětem evoluce „Narodit se a zemřít“ (Niimura 2009; Hayden et al. 2010), typu evoluce multigenových rodin, ve kterém jsou nové geny vytvářeny genovou duplikací. Tyto nové geny pak buď nachází funkci a jsou v genomu udrženy dlouhou dobu, nebo funkci nenachází a jsou buď pseudogenizovány, nebo z genomu eliminovány (Nei et al. 2008).

Expresce jediného olfaktorického receptoru (a jen jedné jeho alely) z celého repertoáru OR genů v OSN je popsána modelem „Jeden neuron-jeden receptor“ (Imai & Sakano 2009). Každý odorant je rozpoznáván celým spektrem olfaktorických receptorů, jak popisuje receptorový kód (Kajiya et al. 2001). Ektopická exprese olfaktorických receptorů v řadě tkání (Feldmesser et al. 2006), schopnost ORs v heterologním expresním systému aktivovat řadu G-proteinů (Touhara & Vosshall 2009) a funkce olfaktorických receptorů ve spermích a svalech (Spehr et al. 2003; Griffin et al. 2009) ukazují na biomedicínskou důležitost ORs.

Přehled použité literatury

* před publikací poukazuje na sekundární citaci, za primárním zdrojem je proto uveden autor citující primární zdroj.

Alioto, T. & Ngai, J., 2005. The odorant receptor repertoire of teleost fish. *BMC Genomics*, 6(1), s.173.

Aloni, R., Olender, T. & Lancet, D., 2006. Ancient genomic architecture for mammalian olfactory receptor clusters. *Genome Biology*, 7(10), s.R88-R88.

*Altner, H., 1962. Untersuchungen über Leistungen und Bau der Nase des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (Daudin, 1803). *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, 45(3), s.272-306; podle Freitag et al. 1995.

Amo, L. et al., 2008. Predator odour recognition and avoidance in a songbird. *Functional Ecology*, 22(2), s.289-293.

Astvatsaturov A. et al., 1997. Functional expression of olfactory-adrenergic receptor chimeras and intracellular retention of heterologously expressed olfactory receptors. *Molecular Brain Research*, 48, s.270-278.

Bakalyar, H. & Reed, R., 1990. Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science*, 250(4986), s.1403 -1406.

Belluscio, L. et al., 1998. Mice Deficient in Golf Are Anosmic. *Neuron*, 20(1), s.69-81.

Berghard, A. & Dryer, L., 1998. A novel family of ancient vertebrate odorant receptors. *Journal of Neurobiology*, 37(3), s.383-392.

Bhandawat, V., Reisert, J. & Yau, K.-W., 2005. Elementary Response of Olfactory Receptor Neurons to Odorants. *Science*, 308(5730), s.1931 -1934.

Boekhoff, I & Breer, H, 1992. Termination of second messenger signaling in olfaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(2), s.471 -474.

Boekhoff, I et al., 1992. Odor-induced phosphorylation of olfactory cilia proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(24), s.11983 -11987.

Brunet, L.J., Gold, G.H. & Ngai, J., 1996. General Anosmia Caused by a Targeted Disruption of the Mouse Olfactory Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channel. *Neuron*, 17(4), s.681-693.

Buck, L. & Axel, R., 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1), s.175-187.

Byerly, T., Robinson, A. & Vieyra, M., 2010. Do Snakes Use Olfactory Receptors in the Nose to Detect Odors?: A Prediction Based on the Percentage of Nonfunctional Olfactory Receptor Genes Amplified in Four Species of Snakes. *Journal of the South Carolina Academy of Science*, 8(1), s.1.

- Von Dannecker, L.E.C., Mercadante, A.F. & Malnic, B., 2006. Ric-8B promotes functional expression of odorant receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), s.9310 -9314.
- Von Dannecker, L.E.C., Mercadante, A.F. & Malnic, B., 2005. Ric-8B, an Olfactory Putative GTP Exchange Factor, Amplifies Signal Transduction through the Olfactory-Specific G-Protein Gaolf. *The Journal of Neuroscience*, 25(15), s.3793 -3800.
- Dietrich, L.E.P. & Ungermann, C., 2004. On the mechanism of protein palmitoylation. *EMBO Rep*, 5(11), s.1053-1057.
- Dong, D. et al., 2009. Evolution of Olfactory Receptor Genes in Primates Dominated by Birth-and-Death Process. *Genome Biology and Evolution*, 1, s.258 -264.
- Feldmesser, E. et al., 2006. Widespread ectopic expression of olfactory receptor genes. *BMC Genomics*, 7, s.121.
- Fleischer, J., Breer, Heinz & Strotmann, Joerg, 2009. Mammalian olfactory receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 3, s.9.
- Floriano, W.B. et al., 2000. Molecular mechanisms underlying differential odor responses of a mouse olfactory receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20), s.10712 -10716.
- Fredriksson, R. & Schiöth, H.B., 2005. The Repertoire of G-Protein–Coupled Receptors in Fully Sequenced Genomes. *Molecular Pharmacology*, 67(5), s.1414 -1425.
- Freitag, J. et al., 1998. Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates. *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 183(5), s.635-650.
- Freitag, Joachim et al., 1999. On the origin of the olfactory receptor family: receptor genes of the jawless fish (*Lampetra fluviatilis*). *Gene*, 226(2), s.165-174.
- Freitag, Joachim et al., 1995. Two classes of olfactory receptors in *xenopus laevis*. *Neuron*, 15(6), s.1383-1392.
- Fukuda, N., 2004. Functional characterization of a mouse testicular olfactory receptor and its role in chemosensing and in regulation of sperm motility. *Journal of Cell Science*, 117(24), s.5835-5845.
- Fukuda, Nanaho & Touhara, Kazushige, 2006. Developmental expression patterns of testicular olfactory receptor genes during mouse spermatogenesis. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 11(1), s.71-81.
- Gaisler, J. & Zima, J., 2007. *Zoologie obratlovců, Vyd. 2. přepracované*, Praha: Academia.
- Gilad, Y. et al., 2004. Loss of Olfactory Receptor Genes Coincides with the Acquisition of Full Trichromatic Vision in Primates. *PLoS Biol*, 2(1), s.e5.
- Gimelbrant, A.A. et al., 1999. Truncation Releases Olfactory Receptors from the Endoplasmic Reticulum of Heterologous Cells. *Journal of Neurochemistry*, 72(6), s.2301-2311.

- Glusman, G. et al., 2000. The olfactory receptor gene superfamily: data mining, classification, and nomenclature. *Mammalian Genome*, 11(11), s.1016-1023.
- Glusman, G. et al., 2001. The Complete Human Olfactory Subgenome. *Genome Research*, 11(5), s.685 -702.
- Go, Y. & Niimura, Y., 2008. Similar Numbers but Different Repertoires of Olfactory Receptor Genes in Humans and Chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 25(9), s.1897 -1907.
- Godfrey, P.A., Malnic, B. & Buck, L.B., 2004. The mouse olfactory receptor gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), s.2156 -2161.
- Goto, T., Salpekar, A. & Monk, M., 2001. Expression of a testis-specific member of the olfactory receptor gene family in human primordial germ cells. *Molecular Human Reproduction*, 7(6), s.553-558.
- Griffin, C.A., Kafadar, K.A. & Pavlath, G.K., 2009. MOR23 promotes muscle regeneration and regulates cell adhesion and migration. *Developmental Cell*, 17(5), s.649-661.
- Hayden, S. et al., 2010. Ecological adaptation determines functional mammalian olfactory subgenomes. *Genome Research*, 20(1), s.1 -9.
- Hino, H. et al., 2009. Molecular biological research on olfactory chemoreception in fishes. *Journal of Fish Biology*, 75(5), s.945-959.
- Churcher, A.M. & Taylor, J.S., 2009. Amphioxus (*Branchiostoma floridae*) has orthologs of vertebrate odorant receptors. *BMC Evolutionary Biology*, 9, s.242-242.
- Churcher, A.M. & Taylor, J.S., 2011. The Antiquity of Chordate Odorant Receptors Is Revealed by the Discovery of Orthologs in the Cnidarian *Nematostella vectensis*. *Genome Biology and Evolution*, 3, s.36 -43.
- Imai, T. & Sakano, H., 2009. Odorant receptor gene choice and axonal projection in the mouse olfactory system. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 47, s.57-75.
- Ito, Y. et al., 1998. Genomic Structure of the Spermatid-Specific Hsp70 Homolog Gene Located in the Class III Region of the Major Histocompatibility Complex of Mouse and Man. *Journal of Biochemistry*, 124(2), s.347 -353.
- Jacobs, G.H. et al., 1996. Trichromatic colour vision in New World monkeys. *Nature*, 382, s.156-158.
- Kajiya, K. et al., 2001. Molecular bases of odor discrimination: Reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(16), s.6018-6025.
- Katada, S. et al., 2005. Structural Basis for a Broad But Selective Ligand Spectrum of a Mouse Olfactory Receptor: Mapping the Odorant-Binding Site. *The Journal of Neuroscience*, 25(7), s.1806 -1815.

- Katada, S., Tanaka, Motonari & Touhara, Kazushige, 2004. Structural determinants for membrane trafficking and G protein selectivity of a mouse olfactory receptor. *Journal of Neurochemistry*, 90(6), s.1453-1463.
- Kato, A., Katada, S. & Touhara, Kazushige, 2008. Amino acids involved in conformational dynamics and G protein coupling of an odorant receptor: targeting gain-of-function mutation. *Journal of Neurochemistry*, 107(5), s.1261-1270.
- Kerr, D.S. et al., 2008. Ric-8B interacts with G[alpha]olf and G[gamma]13 and co-localizes with G[alpha]olf, G[beta]1 and G[gamma]13 in the cilia of olfactory sensory neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 38(3), s.341-348.
- Kishida, T. & Hikida, T., 2010. Degeneration patterns of the olfactory receptor genes in sea snakes. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(2), s.302-310.
- Kishida, T. et al., 2007. The olfactory receptor gene repertoires in secondary-adapted marine vertebrates: evidence for reduction of the functional proportions in cetaceans. *Biology Letters*, 3(4), s.428 -430.
- Kobilka, B. et al., 1988. Chimeric alpha 2-,beta 2-adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. *Science*, 240(4857), s.1310 -1316.
- Kondo, R. et al., 2002. Diversification of olfactory receptor genes in the Japanese medaka fish, *Oryzias latipes*. *Gene*, 282(1-2), s.113-120.
- Kunzelmann, K. et al., 2009. Bestrophin and TMEM16--Ca²⁺ activated Cl⁻ channels with different functions. *Cell Calcium*, 46(4), s.233-241.
- *Laing, 1989. Perception of Complex Smell and Tastes; podle Oka et al. 2004.
- Lapidot, M. et al., 2001. Mouse-Human Orthology Relationships in an Olfactory Receptor Gene Cluster. *Genomics*, 71(3), s.296-306.
- Lefkowitz, R. J. & Caron, M. G., 1993. The Role of Receptor Kinases and Arrestin-like Proteins in G protein-linked Receptor Desensitization.
- Libants, S. et al., 2009. The sea lamprey *Petromyzon marinus* genome reveals the early origin of several chemosensory receptor families in the vertebrate lineage. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), s.180.
- Malnic, B. et al., 1999. Combinatorial Receptor Codes for Odors. *Cell*, 96(5), s.713-723.
- Man, O., Gilad, Y. & Lancet, D., 2004. Prediction of the odorant binding site of olfactory receptor proteins by human–mouse comparisons. *Protein Science*, 13(1), s.240-254.
- Mashukova, A. et al., 2006. β -Arrestin2-Mediated Internalization of Mammalian Odorant Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 26(39), s.9902 -9912.
- Matthews, H.R. & Reisert, J., 2003. Calcium, the two-faced messenger of olfactory transduction and adaptation. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(4), s.469-475.

- McGowen, M.R., Clark, C. & Gatesy, J., 2008. The Vestigial Olfactory Receptor Subgenome of Odontocete Whales: Phylogenetic Congruence between Gene-Tree Reconciliation and Supermatrix Methods. *Systematic Biology*, 57(4), s.574 -590.
- Miller, G., 2004. 2004 Nobel Prizes. Axel, Buck share award for deciphering how the nose knows. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5694), s.207.
- Munger, S.D., Leinders-Zufall, T. & Zufall, F., 2009. Subsystem Organization of the Mammalian Sense of Smell. *Annual Review of Physiology*, 71(1), s.115-140.
- Nagai, Y. et al., 2010. Ric-8B Stabilizes the α Subunit of Stimulatory G Protein by Inhibiting Its Ubiquitination. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), s.11114 -11120.
- Nakamura, T. & Gold, G.H., 1987. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature*, 325(6103), s.442-444.
- Nei, M. & Rooney, A.P., 2005. Concerted and Birth-and-Death Evolution of Multigene Families. *Annual review of genetics*, 39, s.121-152.
- Nei, M., Niimura, Y. & Nozawa, M., 2008. The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. *Nature Reviews. Genetics*, 9(12), s.951-963.
- Neuhaus, E.M. et al., 2006. A Specific Heat Shock Protein Enhances the Expression of Mammalian Olfactory Receptor Proteins. *Chemical Senses*, 31(5), s.445 -452.
- Niimura, Y., 2009. On the Origin and Evolution of Vertebrate Olfactory Receptor Genes: Comparative Genome Analysis Among 23 Chordate Species. *Genome Biology and Evolution*, 1, s.34 -44.
- Niimura, Y. & Nei, M., 2005a. Comparative evolutionary analysis of olfactory receptor gene clusters between humans and mice. *Gene*, 346, s.13-21.
- Niimura, Y. & Nei, M., 2003. Evolution of olfactory receptor genes in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21), s.12235 -12240.
- Niimura, Y. & Nei, M., 2006. Evolutionary dynamics of olfactory and other chemosensory receptor genes in vertebrates. *Journal of Human Genetics*, 51(6), s.505-517.
- Niimura, Y. & Nei, M., 2005b. Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in fishes and tetrapods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(17), s.6039 -6044.
- Niimura, Y. & Nei, M., 2007. Extensive Gains and Losses of Olfactory Receptor Genes in Mammalian Evolution. *PLoS ONE*, 2(8), s.e708.
- Oka, Y. et al., 2004. Olfactory receptor antagonism between odorants. *EMBO J*, 23(1), s.120-126.
- Pace, U. et al., 1985. Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. *Nature*, 316(6025), s.255-258.

- Peppel, K. et al., 1997. G Protein-coupled Receptor Kinase 3 (GRK3) Gene Disruption Leads to Loss of Odorant Receptor Desensitization. *Journal of Biological Chemistry*, 272(41), s.25425 -25428.
- Pifferi, S. et al., 2006. Bestrophin-2 is a candidate calcium-activated chloride channel involved in olfactory transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(34), s.12929 -12934.
- Pilpel, Y. & Lancet, D., 1999. The variable and conserved interfaces of modeled olfactory receptor proteins. *Protein Science*, 8(5), s.969-977.
- Qu, Z., Fischmeister, R. & Hartzell, C., 2004. Mouse Bestrophin-2 Is a Bona fide Cl⁻ Channel. *The Journal of General Physiology*, 123(4), s.327 -340.
- Quignon, P. et al., 2005. The dog and rat olfactory receptor repertoires. *Genome Biology*, 6(10), s.R83-R83.
- Reisert, J. & Restrepo, D., 2009. Molecular Tuning of Odorant Receptors and Its Implication for Odor Signal Processing. *Chemical Senses*, 34(7), s.535 -545.
- Robin, S. et al., 2009. Genetic diversity of canine olfactory receptors. *BMC Genomics*, 10(1), s.21.
- Römpler, H. et al., 2007. G Protein-Coupled Time Travel: Evolutionary Aspects of GPCR Research. *Molecular Interventions*, 7(1), s.17 -25.
- Ronnett, G.V. & Moon, C., 2002. G PROTEINS AND OLFACTORY SIGNAL TRANSDUCTION. *Annual Review of Physiology*, 64(1), s.189-222.
- Satoh, G., 2005. Characterization of novel GPCR gene coding locus in amphioxus genome: Gene structure, expression, and phylogenetic analysis with implications for its involvement in chemoreception. *genesis*, 41(2), s.47-57.
- Shivik, J.A., 1998. Brown Tree Snake Response to Visual and Olfactory Cues. *The Journal of Wildlife Management*, 62(1), s.105-111.
- Schleicher, S. et al., 1993. A beta-adrenergic receptor kinase-like enzyme is involved in olfactory signal termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(4), s.1420 -1424.
- Simpson, S. A., Alexander, D. J. & Reed, C. J., 2005. Induction of heat shock protein 70 in rat olfactory epithelium by toxic chemicals: in vitro and in vivo studies. *Archives of Toxicology*, 79(4), s.224-230.
- Simpson, Sharon A., Alexander, David J. & Reed, Celia J., 2004. Heat shock protein 70 in the rat nasal cavity: localisation and response to hyperthermia. *Archives of Toxicology*, 78(6), s.344-350.
- Singer, M.S., 2000. Analysis of the Molecular Basis for Octanal Interactions in the Expressed Rat I7 Olfactory Receptor. *Chemical Senses*, 25(2), s.155 -165.
- Sklar, P.B., Anholt, R.R. & Snyder, S.H., 1986. The odorant-sensitive adenylate cyclase of

- olfactory receptor cells. Differential stimulation by distinct classes of odorants. *Journal of Biological Chemistry*, 261(33), s.15538 -15543.
- Spehr, M. et al., 2003. Identification of a Testicular Odorant Receptor Mediating Human Sperm Chemotaxis. *Science*, 299(5615), s.2054 -2058.
- Spehr, M. et al., 2006. Odorant receptors and olfactory-like signaling mechanisms in mammalian sperm. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250(1-2), s.128-136.
- Sprang, S., 2001. GEFs: master regulators of G-protein activation. *Trends in biochemical sciences*, 26(4).
- Srivastava, M. et al., 2008. The Trichoplax genome and the nature of placozoans. *Nature*, 454(7207), s.955-960.
- Srivastava, M. et al., 2010. The Amphimedon queenslandica genome and the evolution of animal complexity. *Nature*, 466(7307), s.720-726.
- Steiger, S. et al., 2009. A comparison of reptilian and avian olfactory receptor gene repertoires: Species-specific expansion of group gamma genes in birds. *BMC Genomics*, 10(1), s.446.
- Strader, C., Sigal, I. & Dixon, R., 1989. Structural basis of beta-adrenergic receptor function. *The FASEB Journal*, 3(7), s.1825 -1832.
- Sunahara, R.K. et al., 1997. Interaction of G α with the Cytosolic Domains of Mammalian Adenylyl Cyclase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(35), s.22265 -22271.
- Tall, G.G., Krumins, A.M. & Gilman, A.G., 2003. Mammalian Ric-8A (Synembryn) Is a Heterotrimeric G α Protein Guanine Nucleotide Exchange Factor. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), s.8356 -8362.
- Tatsura, H. et al., 2001. Developing germ cells in mouse testis express pheromone receptors. *FEBS Letters*, 488(3), s.139-144.
- Touhara, Kazushige & Vosshall, L.B., 2009. Sensing Odorants and Pheromones with Chemosensory Receptors. *Annual Review of Physiology*, 71(1), s.307-332.
- Warren, W.C. et al., 2008. Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution. *Nature*, 453(7192), s.175-183.
- Wei, J. et al., 1998. Phosphorylation and Inhibition of Olfactory Adenylyl Cyclase by CaM Kinase II in Neurons: a Mechanism for Attenuation of Olfactory Signals. *Neuron*, 21(3), s.495-504.
- Wong, S.T. et al., 2000. Disruption of the Type III Adenylyl Cyclase Gene Leads to Peripheral and Behavioral Anosmia in Transgenic Mice. *Neuron*, 27(3), s.487-497.
- Zhang, H.-hai et al., 2011. Comparison of the fraction of olfactory receptor pseudogenes in wolf (*Canis lupus*) with domestic dog (*Canis familiaris*). *Journal of Forestry Research*, 22(2), s.275-280.

Zhang, X. & Firestein, S., 2002. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nature Neuroscience*, 5(2), s.124-133.

Zufall, F., Gordon M. Shepherd & Firestein, S., 1991. Inhibition of the Olfactory Cyclic Nucleotide Gated Ion Channel by Intracellular Calcium. *Proceedings: Biological Sciences*, 246(1317), s.225-230.

Internetové zdroje:

GPCRDB, information system for G-protein coupled receptors. <http://www.gpcr.org/7tm/>

HORDE, The Human olfactory Data Explorer. <http://genome.weizmann.ac.il/horde/>