

УДК 577

## ПРАВИЛО “ОДИН НЕЙРОН–ОДИН РЕЦЕПТОР” В ФИЗИОЛОГИИ И ГЕНЕТИКЕ ОБОНЯНИЯ

© 2020 г. М. Ф. Быстрова<sup>а, \*</sup>, С. С. Колесников<sup>а, \*\*</sup>

<sup>а</sup>Федеральный исследовательский центр “Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук” Институт биофизики клетки РАН, Пушкино, Россия

\*e-mail: marinabystrova@rambler.ru

\*\*e-mail: staskolesnikov@yahoo.com

Поступила в редакцию 12.11.2019 г.

После доработки 12.12.2019 г.

Принята к публикации 14.12.2019 г.

Феноменальная чувствительность обонятельной системы и ее способность детектировать самые разнообразные пахучие стимулы в значительной степени обусловлены существованием многочисленных рецепторов запахов. Гены, кодирующие обонятельные рецепторы (ОР), составляют самое большое семейство в геномах млекопитающих. Определяющим принципом в модели кодирования обонятельной информации является правило “один нейрон–один рецептор”, согласно которому каждый из  $10^7$  обонятельных нейронов, локализованных в обонятельном эпителии, выбирает для экспрессии только один ген из семейства ОР генов. Хотя физиологическая целесообразность принципа “один нейрон–один рецептор” представляется несомненной, по сути, это правило носит гипотетический характер и не верифицировано в должной мере экспериментально. В частности, остается открытым вопрос об эпигенетических механизмах стохастической, моногенной и моноаллельной экспрессии ОР-генов. Результаты глубокого секвенирования транскриптомов одиночных клеток неожиданно выявили мульти-рецепторные нейроны, содержащие транскрипты нескольких ОР-генов. Значит ли это, что не работает правило, которое больше 25 лет казалось физиологически оправданным, незыблемым и бесспорным? В обзоре будут предложены различные интерпретации результатов исследования транскриптомов одиночных обонятельных нейронов, способные объяснить существование “мультирецепторных” нейронов и их роль в процессе обонятельного нейрогенеза.

**Ключевые слова:** обонятельный нейрон, обонятельный рецептор, нейрогенез, кодирование информации, одиночная клетка, sc-RNA-seq

**DOI:** 10.31857/S0301179820030042

### ВВЕДЕНИЕ

Обонятельная система млекопитающих способна к молекулярному узнаванию десятков тысяч запахов в широчайшем диапазоне концентраций с чувствительностью, предполагающей, что связывание одиночных молекул может вызывать физиологически значимые ответы. Процесс детекции запахов начинается со связывания молекулы пахучего вещества на рецептирующей поверхности обонятельных нейронов, вовлекает внутриклеточные системы усиления сигнала и кодирования сенсорной информации в виде электрического импульса и заканчивается анализом информации в мозге. Феноменальная чувствительность обонятельной системы и ее способность распознавать различные комбинации пахучих веществ в значительной степени является следствием существования разнообразных обонятельных рецепторов (ОР). Гены, кодирующие

ОР, составляют самое большое семейство в геномах млекопитающих. Определяющим принципом в модели кодирования обонятельной информации является правило “один нейрон–один рецептор”, согласно которому каждый из приблизительно 10 млн обонятельных нейронов, локализованных в обонятельном эпителии, в процессе развития выбирает для экспрессии только один ген из семейства ОР-генов, и его экспрессия носит стохастический моноаллельный характер. Механизмы, определяющие выбор нейроном для экспрессии только одного ОР-гена из более тысячи, до сих пор непонятны. В частности, открытым остается вопрос, на какой стадии дифференцировки нейрона запускается активация выбранного ОР-гена, а также каким образом в геноме достигается сайленсинг всех ОР-генов, кроме одного. В последние годы были опубликованы работы с использованием глубокого секвенирования транскриптомов

одинокных обонятельных нейронов (scRNA-seq), выполненные с целью верификации принципа “один нейрон—один рецептор”. Для понимания механизмов, вовлеченных в реализацию этого принципа, в обзоре представлена информация о семействе обонятельных рецепторов, строении периферического обонятельного анализатора и обонятельном нейрогенезе. В обзоре также отражены пионерские работы 2019 года, в которых получены данные, показывающие, что регуляция экспрессии ОР-генов определяется уникальной пространственной архитектурой генома обонятельного нейрона, в формировании которой решающими являются межхромосомные контакты.

### СЕМЕЙСТВО ОБОНЯТЕЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Молекулярное узнавание запахов обеспечивается обонятельными рецепторами, которые относятся к суперсемейству гептаспиральных рецепторов, имеющих в структуре семь трансмембранных альфа-спиральных доменов, сигнальная функция которых обеспечивается сопряжением с гетеротримерными G-белками (G-protein coupled receptors, GPCR). Впервые ОР были идентифицированы в обонятельном эпителии крысы в 1991 году с помощью молекулярного клонирования [5]. Авторы *a priori* постулировали, что ОР должны принадлежать к семейству GPCR рецепторов, и что они должны быть специфически локализованы в обонятельном нейроэпителии — ткани, где происходит первичная детекция запахов. Клонирование ОР крысы было выполнено с применением реакции обратнo-транскриптазной ПЦР с вырожденными праймерами, сконструированными на основе консервативных участков, идентифицированных к тому времени последовательно GPCR-рецепторов. Гены обонятельных рецепторов составляют самое большое семейство в геномах млекопитающих, численность которого различна у разных видов [8, 55]. Так, семейство ОР-генов у крысы насчитывает 1715 представителей, из которых 508 (30%) являются псевдогенами, в геноме мыши 1130 функциональных ОР-генов с интактной открытой рамкой считывания и 236 (21%) псевдогенов, а у человека семейство насчитывает 816 генов, половина (425) из которых псевдогены [14]. Таким образом, функциональных ОР-генов у человека значительно меньше, чем у других млекопитающих. Общепринятое объяснение заключается в том, что человек для выживания меньше нуждается в обонянии, чем остальные животные. Хотя считается, что у собаки исключительно тонкое обоняние, число функциональных генов в геноме собаки (811) меньше, чем у коровы (970) или африканского слона (2000) [36, 37]. Аминокислотная последовательность ОР включает  $320 \pm 25$  остатков, разница в

длине преимущественно является следствием вариабельности N- и C-концов рецепторов. Большинство представителей семейства до сих пор остаются кандидатами на роль обонятельных рецепторов, поскольку агонисты были установлены только для нескольких из них. Сложность идентификации агониста состоит в том, что в гетерологических системах экспрессии отсутствуют транспортные системы, которые в обонятельных нейронах обеспечивают транспорт ОР к рецептирующей поверхности. Поэтому за редким исключением в гетерологической системе рекомбинантные ОР остаются “застрявшими” в эндоплазматическом ретикулуме и являются нефункциональными с точки зрения трансдукции специфических агонистов, что препятствует их физиологической идентификации.

### ПЕРИФЕРИЧЕСКАЯ ОБОНЯТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Периферическая обонятельная система млекопитающих состоит из нескольких анатомически обособленных подсистем, расположенных в носовой полости, и у разных видов они представлены в разных комбинациях [3]. Например, у мыши периферический обонятельный анализатор включает главный обонятельный эпителий, вомеронасальный орган, септальный орган Масера и ганглий Грунеберга (рис. 1). У собаки отсутствуют септальный орган и ганглий Грунеберга [1], а у человека обонятельная система редуцирована до главного обонятельного эпителия. Вомеронасальный орган в обонятельной системе служит для детекции феромонов — молекул, которые выделяются животными и служат сигналами, определяющими генетически запрограммированное социальное поведение представителей одного и того же вида, связанное с репродуктивной функцией, агрессией, защитой территории и социальным доминированием [4]. Ганглий Грунеберга специализирован на рецепции летучих молекул, которые служат сигналами опасности и вызывают поведенческие реакции, ассоциированные со страхом [26]. Септальный орган содержит нейроны, экспрессирующие рецепторы феромонов и TAARS-рецепторы и, по-видимому, выполняет ту же функцию, что и вомеронасальный орган. Отсутствие у человека полного набора периферических обонятельных подсистем может указывать на эволюционно детерминированную потерю необходимости обнаружения всего разнообразия обонятельных сигналов, детектируемых, например, мышью. Альтернативное объяснение состоит в том, что главный обонятельный эпителий у человека способен выполнять все функции, которые у других животных обособлены в различных обонятельных подсистемах. Ниже будет обсуждаться клеточная организация главного

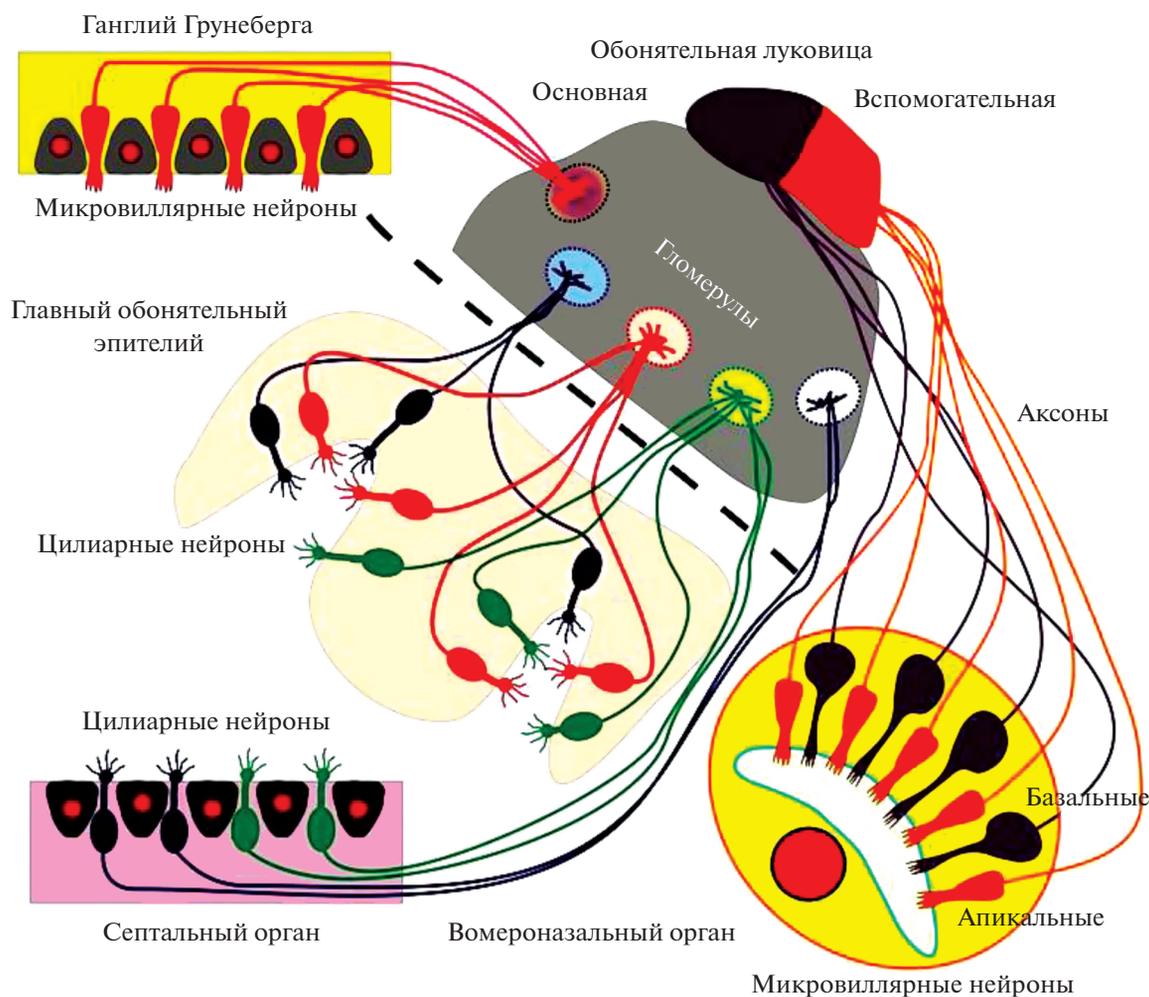


Рис. 1. Хемосенсорные подсистемы периферической обонятельной системы грызунов.

обонятельного эпителия, поскольку эта подсистема есть у всех животных. Кроме того, обонятельный эпителий содержит самое большое количество сенсорных нейронов (примерно 10 млн), большинство из которых экспрессируют ОР-гены.

В состав главного обонятельного эпителия входят (рис. 2) горизонтальные базальные клетки, глобозные базальные клетки, опорные клетки (sustentacular cells), сенсорные нейроны и секреторные клетки Боуменовых желез, секретирующие компоненты обонятельной слизи, покрывающей обонятельный эпителий [31]. Обонятельные нейроны – это биполярно вытянутые клетки, от базальной части нейрона аксон проецируется в составе обонятельного нерва к гломерулам обонятельной луковицы, где происходит первичный процессинг обонятельной информации для ее дальнейшего анализа в сенсорной коре головного мозга. От дистальной части тела нейрона отходит дендрит, который пробивается к поверхности эпителия между телами опорных клеток и заканчивается утолщением – обонятельной булавой.

Булава увенчана 8–15 обонятельными цилиями диаметром 0.25 мкм и длиной до 20 мкм. Множественные цилии, на мембране которых локализованы ОР, обеспечивают достаточно обширную рецептирующую поверхность индивидуального обонятельного нейрона. Цилии контактируют с обонятельной слизью на поверхности эпителия, которая является средой, где концентрируются запахи для связывания с ОР. Тела нейронов от прямого контакта с внешней средой защищены слоем плотно прилегающих друг к другу опорных клеток, образующих между собой и с обонятельными нейронами плотные контакты, практически не проницаемые для ионов и органических молекул.

### ОБОНЯТЕЛЬНЫЙ НЕЙРОГЕНЕЗ

Обонятельный эпителий служит привлекательной моделью для изучения процессов нейрогенеза из-за способности обонятельных нейронов к анатомическому и функциональному вос-

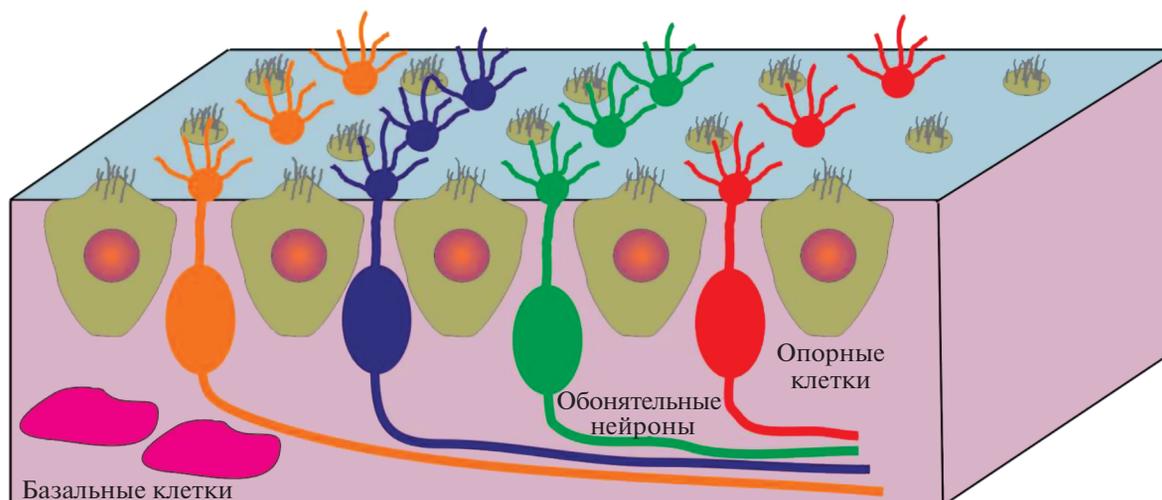


Рис. 2. Анатомическая организация главного обонятельного эпителия млекопитающих и основные типы клеток.

становлению [20, 44]. Известно, что во взрослом организме нейрогенез происходит в субгранулярной зоне гиппокампа, субвентрикулярной зоне боковых желудочков мозга и в обонятельном эпителии в результате самообновления и дифференциации нейрональных клеток-прогениторов. Если сравнивать с другими нейрональными системами, обонятельный эпителий имеет беспрецедентную способность к обновлению и регенерации, поддерживаемую на протяжении всей жизни животного. Это свойство было известно уже в середине прошлого века, когда еще не была разработана концепция существования мультипотентных прогениторных клеток в тканях взрослых животных. Впервые способность обонятельных нейронов к регенерации была обнаружена в 1951 году после разрушения обонятельного эпителия аппликацией раствора сульфата цинка у лягушек [49]. Затем полное восстановление обонятельного эпителия после повреждения сульфатом цинка было продемонстрировано в экспериментах на макаке-резус [45]. Феномен восстановления нейро-эпителия был настолько необычен, что автор этой работы Эдвин Шульц предположил, что обонятельные нейроны являются примитивными нейрональными клетками, отличающимися от других нейронов позвоночных уникальной способностью к регенерации [45]. В 70-е годы было установлено, что даже в отсутствии повреждений в обонятельном эпителии происходит регулярное обновление обонятельных нейронов [10]. Время жизни нейрона составляет по разным оценкам от двух до трех месяцев [9, 23]. В настоящее время считается, что среди базальных клеток обонятельного эпителия есть две популяции прогениторных клеток – это горизонтальные и глобозные базальные клетки. Горизонтальные клетки неактивны в нормальных физиологических условиях.

Их митотическая активность стимулируется разного рода повреждениями обонятельного эпителия, причем эти повреждения обязательно должны сопровождаться гибелью опорных клеток. Следует отметить, что опорные клетки обонятельного эпителия также способны к митотическому делению, но они не мультипотентны. Глобозные клетки, составляющие популяцию мультипотентных прогениторных клеток, митотически активны при нормальных физиологических условиях на протяжении всей жизни животного и способны к дифференцировке в опорные клетки и в обонятельные нейроны. Мультипотентные клетки не мигрируют, их локализация у базальной мембраны остается неизменной. В процессе дифференцировки происходит миграция клеток по направлению от базальной мембраны к апикальной поверхности обонятельного эпителия, поэтому в обонятельном эпителии ядра обонятельных нейронов, находящихся на разных стадиях созревания, расположены на разных уровнях [20]. В процессе развития нейроны экспрессируют определенные маркерные гены различных стадий дифференцировки. Уникальным маркером зрелых обонятельных нейронов считается обонятельный маркерный белок ОМР – мажорный цитозольный белок с молекулярной массой 18 кДа, расположенный во всех частях нейрона, а также в обонятельной луковице. Его функция до сих пор не установлена с определенностью, хотя есть некоторые данные, что ОМР вовлечен в процесс трансдукции обонятельного стимула [54]. С точки зрения физиологии, зрелыми считаются нейроны, установившие синаптические контакты с нейронами обонятельной луковицы. Кроме того, дендрит зрелого нейрона обязательно должен достичь поверхности обонятельного эпителия, поскольку только таким образом обонятельные ре-

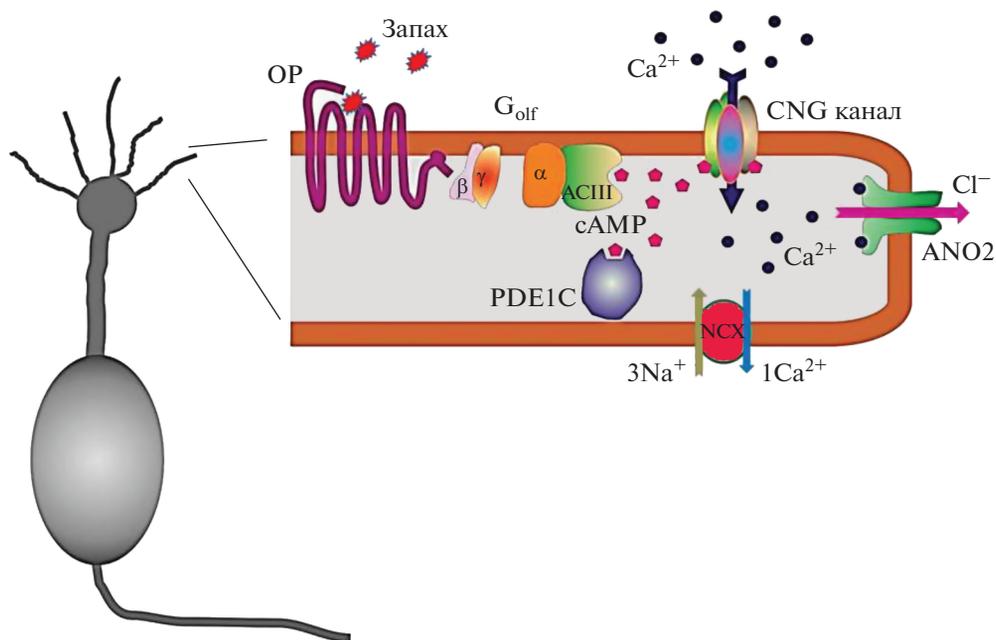


Рис. 3. Основные элементы каскада трансдукции в цилиарных нейронах, экспрессирующих обонятельные рецепторы (ОР).

цепторы, расположенные на поверхности цилий дендрита, могут получить доступ к молекулам запахов.

При исследованиях транскриптомов одиночных нейронов (разговор о которых пойдет ниже в обзоре) по маркерным генам были выделены следующие стадии развития: прогенитор, прекурсор, ранний незрелый нейрон, поздний незрелый и зрелый нейрон [11]. И даже в категории зрелых нейронов были выделены две стадии зрелости [43]. Описание стадий нейрогенеза в обонятельном эпителии в рамках данного обзора нам представляется важным для последующего объяснения результатов секвенирования транскриптомов одиночных клеток, изолированных из обонятельного эпителия, а также для ознакомления с регуляторными механизмами экспрессии ОР-генов.

### ПОПУЛЯЦИЯ СЕНСОРНЫХ НЕЙРОНОВ И ПРОЦЕСС ТРАНСДУКЦИИ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ СТИМУЛОВ

Обонятельные нейроны – это хемосенсорные клетки, специализирующиеся на детекции молекул запахов, трансдукции обонятельного сигнала, его кодировании в форме последовательности электрических импульсов и пропорционального выброса нейротрансмиттера в соответствующейglomerуле обонятельной луковицы. Обонятельная трансдукция – это процесс преобразования внешнего химического сигнала во внутриклеточный электрохимический сигнал. Трансдукция обонятельных стимулов происходит в обонятель-

ных цилиях, где локализованы соответствующий рецепторный и сигнальный аппарат, и для большинства запахов протекает следующим образом (рис. 3).

Связывание молекулы запаха с обонятельным GPCR рецептором инициирует переход рецептора в активную конформацию, в которой он способен последовательно активировать G-белок из семейства  $G_s$  ( $G_{olf}$ ), катализируя GDP–GTP обмен в их  $\alpha$ -субъединице и инициируя распад гетеротримера на  $\alpha$ -субъединицу ( $G_{\alpha olf}$ ) и  $\beta\gamma$ -комплекс. В свою очередь, связываясь с аденилатциклазой (AC3 изоформа),  $G_{\alpha olf}$  активирует этот фермент и инициирует скачкообразное увеличение продукции циклического аденозинмонофосфата (сАМР). Этот вторичный медиатор регулирует ионную проницаемость мембраны обонятельных цилий, в которой функционируют катионные каналы CNG (cyclic nucleotide-gated), напрямую активируемые сАМР [34]. CNG-канал обонятельных нейронов представляют собой гетеротетрамер, формируемый двумя порообразующими субъединицами CNGA2 и двумя регуляторными субъединицами CNGA4 и CNGB1b, каждая из которых несет сайт связывания циклических нуклеотидов на цитоплазматическом С-конце [56]. Иницированное сАМР открытие  $Ca^{2+}$ -проницаемых CNG-каналов приводит к деполяризации мембраны обонятельного нейрона, которая усиливается за счет входа наружного  $Ca^{2+}$ , стимуляции  $Ca^{2+}$ -активируемых анионных каналов ANO2 и выхода ионов  $Cl^-$  из клетки [40]. Генерируемый

таким образом рецепторный потенциал инициирует серию потенциалов действия, распространяющихся по аксону в гломерулу и вызывающих выброс афферентного нейротрансмиттера глутамата [35]. Деактивация каскада трандукции включает несколько стадий, в том числе гидролиз сАМФ фосфодиэстеразой PDE1C и релаксацию внутрицелиального  $Ca^{2+}$  к уровню покоя преимущественно за счет откачки  $Na^+/Ca^{2+}$  обменником (рис. 3).

Среди приблизительно 10 млн сенсорных нейронов главного обонятельного эпителия небольшая субпопуляция экспрессирует рецепторы TAARS (Trace Amine-Associated Receptors), кодируемые 15 генами у мыши и 6 генами у человека. Эти нейроны формируют отдельную обонятельную подсистему для детекции летучих аминов, вызывающих инстинктивные поведенческие реакции у животных, связанные с отвращением или пристрастием. К лигандам рецепторов TAARS, например, относятся продукт гнилостного распада белков кадаверин и запах хищника 2-фенилэтиламин [19, 21]. Нейроны, экспрессирующие TAARS-рецепторы используют канонический аденилатциклазный каскад обонятельной трандукции. Кроме того, в главном обонятельном эпителии были найдены хемосенсорные нейроны, использующие цГМФ в качестве вторичного посредника и экспрессирующие рецепторную гуанилатциклазу D (GC-D), кодируемую геном *Gucy2d* и цГМФ-активируемый канал CNGA3. Эти нейроны проецируют аксоны к области гломерул ожерелья (nucleus glomeruli), расположенной между главной и аксessorной обонятельными луковицами [15]. В качестве стимулов, способных стимулировать GC-D-нейроны, идентифицированы углекислый газ в микромолярных концентрациях, моча, которая у мышей служит источником социальных сигналов, и продукт дыхания грызунов дисульфид углерода, который связан с социальными предпочтениями выбора пищи у крыс. Таким образом, считается, что GC-D-нейроны обонятельного эпителия специализируются на детекции сигналов, отвечающих за поведенческие реакции социального характера у животных [16, 17, 33]. Интересно, что ген *Gucy2d* у человека является псевдогеном. Еще один клеточный тип с неканоническим каскадом обонятельной трандукции, найденный в главном обонятельном эпителии — это нейроны, которые помимо CNGA2 канала, управляемого цАМФ, экспрессируют еще катионный канал TRPC2, который является исполнительным элементом в сигнальном каскаде в хемосенсорных нейронах вомероназального органа, экспрессирующих рецепторы феромонов [4]. TRPC2/CNGA2-положительные нейроны главного обонятельного эпителия не экспрессируют рецепторов феромонов [38]. В некоторых из них была обнаружена аденилат циклаза AC3 (клетки типа А), а в других

растворимая гунилат циклаза *Gucylb2* (клетки типа В). Клетки типа В являются сенсорами уровня кислорода в окружающей среде [2]. Транскрипты ОР-генов были обнаружены только в некоторых клетках типа А [39], при этом какие рецепторные молекулы функционируют в клетках типа В остается неизвестным.

Итак, в главном обонятельном эпителии функционируют два типа нейронов с каноническим каскадом трандукции сигнала — это ОР-нейроны и TAARS-нейроны. Кроме того, в нем обнаружены три типа нейронов с неканоническим каскадом. Во-первых, GC-D-нейроны, в них в трандукцию сигнала вовлечены цГМФ и канал CNGA3. Во-вторых, TRPC2/CNGA2-положительные нейроны. И, в-третьих, TRPC2/CNGA2-положительные нейроны, содержащие растворимую гунилат циклазу *Gucylb2*. Нейроны, содержащие обонятельные рецепторы, являются доминантной популяцией, все остальные нейроны составляют лишь незначительные по численности субпопуляции главного обонятельного эпителия. Интересно отметить, что правилу “один нейрон—один рецептор” в периферической обонятельной системе подчиняются не только ОР-нейроны, но и нейроны всех остальных типов с каноническим и неканоническим каскадами сигнальной трандукции.

#### ПРАВИЛО “ОДИН НЕЙРОН—ОДИН РЕЦЕПТОР” И КОМБИНАТОРНЫЙ ПРИНЦИП КОДИРОВАНИЯ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ИНФОРМАЦИИ

В физиологии обонятельной системы определяющей является концепция “один нейрон—один рецептор”, согласно которой каждый нейрон случайным образом выбирает для экспрессии только один ген из семейства ОР-генов [24, 46, 47]. Этот выбор определяет функциональную идентичность клетки, физиологическая специализация которой состоит в детекции ограниченного набора определенных запахов. Экспрессия ОР-генов носит моноаллельный характер: 50% нейронов экспрессируют ген с материнского аллеля, а 50% с отцовского [13]. Моногенный характер экспрессии ОР-генов определяет исключительную гетерогенность нейронов обонятельного эпителия. Учитывая, например, что у мыши семейство насчитывает 1130 интактных ОР-генов [14], в рамках правила “один нейрон—один рецептор” в обонятельном эпителии должно существовать как минимум 1130 функционально различных субпопуляций ОР-нейронов. Два близлежащих в обонятельном эпителии нейрона никогда не экспрессируют один и тот же ОР. Хотя нейроны с одинаковым рецептором мозаично разбросаны в одной из четырех анатомически не пересекающихся областей главного обонятельного эпителия, они посылают аксоны к одним и тем же гломерулам [41,

42, 52, 53]. Хотя в обонятельной луковице насчитывается приблизительно 1800 гломерул, аксоны нейронов с одинаковым рецептором проецируются только к двум из них [28]. Интересно, что ОР локализованы не только в обонятельных цилиях, но также присутствуют в аксоне обонятельного нейрона. Считается, что ОР, локализованный в аксоне, играет роль гида, направляющего аксон к нужной мишени в луковице [12].

Для кодирования обонятельной информации важным является то, что ОР не обладают идеальной специфичностью: каждый рецептор активируется не одним, а несколькими запахами. Такая относительно низкая специфичность рецепторов, вероятно, позволяет обонятельной системе детектировать *a priori* незнакомый запах и впоследствии его идентифицировать. Кроме того, индивидуальный запах распознается несколькими обонятельными рецепторами, формирующими достаточно уникальную комбинацию. Поэтому каждый запах вызывает только ему свойственный, уникальный паттерн активности определенного ансамбля нейронов главного обонятельного эпителия. Различные запахи активируют разные комбинации сенсорных нейронов, обеспечивая комбинаторный принцип кодирования обонятельной информации [24, 52, 53]. Паттерн аксональной конвергенции сенсорных нейронов диктует специфичность ответа на запахи вторичных нейронов обонятельной луковицы. В луковице происходит анатомическое картирование активности сенсорных нейронов обонятельного эпителия. Нейроны луковицы, в свою очередь, посылают аксоны в подкорковую область и в кору головного мозга, где происходит окончательная обработка обонятельной информации. Правило “один нейрон—один рецептор” физиологически оправданно. Если бы в каждом нейроне экспрессировались множественные ОР-гены, количество различных комбинаций электрической активности обонятельных нейронов было бы сильно уменьшено и возможности комбинаторного кодирования обонятельной информации были бы сильно редуцированы. Как экстремальный пример, система обонятельных нейронов, экспрессирующих все ОР, способна оценить интенсивность пахучего стимула, но не способна обеспечить определение качественных различий между запахами.

Интересно, что концепция комбинаторного кодирования обонятельной информации была разработана на основе физиологических экспериментов задолго до идентификации обонятельных рецепторов [32]. Хотя молекулярная природа ОР в те времена еще не была известна, уже были получены функциональные доказательства низкой специфичности индивидуальных обонятельных нейронов по отношению к запахам. На основе этого постулировалось, что распознавание индивидуального запаха зависит от одновременной

активации определенного ансамбля хемосенсорных клеток, и что разные запахи должны вызывать характерные пространственно-временные паттерны активности популяции обонятельных нейронов.

Фундаментальное значение для развития концепции “один нейрон—один рецептор” имели исследования экспрессии генов обонятельных рецепторов, выполненные на одиночных нейронах, изолированных из обонятельного эпителия мыши, в 1999 году [24]. Эксперименты выполнялись с применением метода экспоненциальной амплификации кДНК. Обратная транскрипция проводилась с использованием поли-(dT) праймера, затем на 3'-конец синтезированной первой цепи кДНК с помощью терминальной трансферазы добавлялась поли-А последовательность. В результате, первая цепь кДНК содержала на 5'- и 3'-концах поли-Т и поли-А последовательности соответственно, и могла быть амплифицирована в реакции ПЦР с одиночным олиго-(dT) праймером. Глобально амплифицированная кДНК одиночного нейрона затем использовалась в качестве матрицы в ПЦР с вырожденными праймерами, созданными на основе консервативных участков последовательностей генов GPCR-рецепторов. Секвенирование продуктов ПЦР показало, что в каждом обонятельном нейроне обнаруживается транскрипт только одного гена из обширного репертуара семейства ОР-генов. Работа [24] явилась фактически первой попыткой экспериментальной верификации принципа “один нейрон—один рецептор”.

Следует отметить, что метод глобальной амплификации кДНК был детализирован выше по нескольким причинам. Во-первых, в свое время он безусловно был пионерским при исследовании профиля экспрессии генов в одиночных клетках. Кроме того, ровно через 20 лет один из авторов работы [24] Линда Бак и соавторы применили тот же самый подход при конструировании кДНК клонотек одиночных обонятельных нейронов для RNA-seq [11]. Первый этап создания клонотек для scRNA-seq по-прежнему включал лизис индивидуальных клеток, синтез кДНК и ее последующую глобальную амплификацию.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСКРИПТОМОВ ЗРЕЛЫХ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ

Применение технологии глубокого секвенирования позволяет сегодня проводить широкомасштабные исследования транскриптомов одиночных клеток. В 2015 году вышло сразу три независимых работы с результатами scRNA-seq одиночных обонятельных нейронов [11, 43, 50]. Конечной целью этих исследований было проведение экспериментальной проверки канонического правила “один нейрон—один рецептор”

уже на уровне транскриптома одиночной клетки. Различные модификации метода экспоненциальной амплификации кДНК использовались при создании клонотек одиночных обонятельных нейронов для секвенирования на платформе Illumina. Синтез клонотек для секвенирования осуществлялся либо вручную [11], либо с использованием автоматизированной микрофлюидной системы mRNA-seq C1 (Fluidigm) [43, 50]. В работе [43] исследовалась экспрессия ОР-генов только в зрелых нейронах, изолированных с помощью FACS – сортировки из клеток, выделенных из обонятельного эпителия трансгенных OMP-GFP мышей, у которых ген зеленого флуоресцентного белка GFP экспрессирован под промотором гена, кодирующего канонический маркер зрелых обонятельных нейронов OMP. Наличие флуоресценции GFP в клетке служит доказательством активности промотора OMP. Всего были сконструированы клонотеки 21 клетки. По результатам секвенирования в двух клетках транскрипты ОР-генов обнаружены не были. Однако анализ транскриптомов позволил выявить их принадлежность к недавно открытому нейрональному типу Trpc2-положительных клеток В [39]. Во всех остальных 19 клетках были обнаружены транскрипты только одного ОР-гена, экспрессированного на исключительно высоком уровне. Кроме того, в каждой клетке на очень низком фоновом уровне также присутствовали транскрипты от 11 до 28 дополнительных ОР-генов. Количество фоновых транскриптов в каждой клетке отличалось больше, чем на три порядка от количества транскриптов сверхэкспрессированного ОР-гена. Для объяснения присутствия фоновых транскриптов авторы проанализировали данные scRNA-seq 288 эмбриональных стволовых клеток мыши и 96 Т-лимфоцитов-хелперов и обнаружили, что во всех этих клетках, не имеющих никакого отношения к обонянию, также присутствуют на очень низком фоновом уровне транскрипты различных ОР-генов. В последние годы появилось много информации об обнаружении транскриптов ОР-генов в различных клетках и тканях, которые не могут выполнять специфическую обонятельную функцию [7]. Этот феномен получил название эктопической экспрессии ОР-генов. Как известно, минимальным критерием того, что ген кодирует рецептор запаха является его экспрессия в обонятельном нейроне, выполняющем специфическую обонятельную функцию. Авторы [43] делают справедливое заключение, что транскриптами ОР-генов, представленными на фоновом уровне, можно пренебречь, поскольку их наличие не является специфическим свойством обонятельных нейронов, они также эктопически экспрессированы в клетках многих других типов. Специфически экспрессируя на высоком уровне только один ОР-ген, каждый зрелый нейрон под-

чиняется правилу “один нейрон—один рецептор”. В работе [43] также была подтверждена моноаллельная экспрессия ОР-генов путем анализа SNP-полиморфизма у отдельных ОР-генов, экспрессированных с C57BL/6- или 129P2-аллеля у гетерозиготных OMP-GFP мышей смешанной линии C57BL/6-129P2.

### ТРАНСКРИПТОМ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Рассмотрим результаты двух независимых работ, где исследовались транскриптомы нейронов, случайным образом изолированных из ткани обонятельного эпителия в результате ее механической и энзиматической обработки [11, 50]. Среди них были клетки на разных стадиях развития, включая поздние клетки-прекурсоры, ранние незрелые, поздние незрелые и зрелые нейроны. Степень зрелости нейрона устанавливалась по профилю экспрессии известных маркеров нейрональной дифференцировки. Исследование статуса ОР-генов в процессе развития нейронов позволили установить интересные закономерности. В работе [11] было показано, что количество ОР-транскриптов в клетках в процессе дифференцировки растет. Транскрипты ОР-генов были обнаружены в 1 из 9 клеток-прекурсоров, в 38 из 40 незрелых и в 25 из 25 зрелых нейронов. Самый интересный результат scRNA-seq анализа состоял в выявлении мультирецепторных нейронов, содержащих транскрипты нескольких ОР-генов. Ко-экспрессия различных ОР-генов была обнаружена в 48% ранних незрелых, в 46% поздних незрелых и в 24% зрелых нейронах, причем ранние незрелые нейроны ко-экспрессировали до 12 транскриптов, а зрелые уже не больше 3 [11]. Большинство незрелых мультирецепторных клеток содержали транскрипты различных ОР-генов на приблизительно одинаковом низком уровне. В трех зрелых нейронах также были найдены транскрипты 2-3 ОР-генов на приблизительно одинаковом низком уровне, однако в трех остальных – один ОР-транскрипт был сверхэкспрессирован, а представленность остальных была по сравнению с ним приблизительно в 30 раз меньше. По результатам scRNA-seq авторы [11] отметили следующие закономерности. Во-первых, количество транскриптов ОР-генов в обонятельных нейронах неуклонно растет в процессе дифференцировки. Во-вторых, многие незрелые нейроны содержат на низком уровне транскрипты нескольких ОР-генов. В-третьих, в процессе развития способность ко-экспрессировать ОР-гены постепенно пропадает, зрелые нейроны преимущественно экспрессируют только один ОР-ген, и уровень его экспрессии выше, чем в незрелых клетках. Кроме того, отметим, что суммарное количество ОР-транскриптов

сильно отличается от клетки к клетке, и эти межклеточные вариации особенно заметны в популяции зрелых нейронов.

Похожие закономерности были выявлены в исследовании [50]. Среди незрелых нейронов 24% клеток (13/54) экспрессировали 1 ОР-ген, 31.5% (17/54) – от 2 до 9 генов, 22.2% (12/54) не содержали ОР-транскриптов, и статус транскриптов не был установлен с определенностью в 22.2% (12/54) клеток. Это соотношение резко менялось в популяции зрелых нейронов и было следующим: 83.3% (65/79)–3.8% (3/79)–3.8% (3/79)–10.1% (8/79). Как и в работе [11], scRNA-seq анализ выявил существенные межклеточные вариации в уровне экспрессии ОР-генов. Представленность ОР-транскриптов в транскриптомах одиночных нейронов отличалась более, чем на три порядка, при этом суммарное количество ОР-транскриптов в мультирецепторных нейронах было несколько ниже по сравнению с одно-рецепторными.

#### РАЗНОГЛАСИЯ В РЕЗУЛЬТАТАХ SCRNA-SEQ

Анализ трех независимых работ выявляет разногласия в результатах RNA-seq одиночных обонятельных нейронов. Работа [43] полностью подтверждает правило “один нейрон–один рецептор”, на котором строится современная модель кодирования обонятельной информации, а результаты [11] и [50] ставят его под сомнение, т.к. предоставляют доказательства существования мультирецепторных клеток. В настоящее время существуют две концепции, объясняющие выбор нейроном только одного гена для экспрессии (“OR gene choice”). Согласно первой, нейрон выбирает для экспрессии один ОР-ген из многочисленного семейства, и по механизму отрицательной обратной связи продукция рецепторного белка в клетке подавляет экспрессию остальных ОР-генов [6, 18, 48]. Эта модель допускает, что в процессе развития может произойти переключение экспрессии одного ОР-гена на другой, но не одновременную ко-экспрессию нескольких ОР-генов. Согласно второй, менее популярной концепции, каждый нейрон способен к транзактной ко-экспрессии нескольких ОР-генов, однако в процессе развития стабильно активным в клетке остается лишь один [27]. Исходя из данных scRNA-seq, показывающих, что мультирецепторные клетки обогащены в популяции незрелых нейронов и что уровень экспрессии ОР-генов в них ниже, чем в зрелых клетках, экспрессирующие одиночный ген, авторы работ [11, 50] приходят к одинаковому заключению, что полученные ими результаты подтверждают вторую концепцию [27]. Для примирения правила “один нейрон–один рецептор” с фактом существования мульти-

рецепторных клеток была выдвинута следующая модель [11, 50]. На ранних стадиях дифференцировки незрелый нейрон временно экспрессирует на низком уровне несколько ОР-генов. В процессе развития экспрессия всех ОР-генов, кроме одного, затухает за счет механизмов эпигенетической регуляции, и в зрелой клетке остается активным только один ОР-ген [11, 50]. Наличие небольшого количества мультирецепторных клеток среди зрелых нейронов, однако, ставит под сомнение предложенную гипотезу. Кроме того, есть еще одно расхождение гипотезы с результатами [50] – это наличие нейронов, вообще не содержащих ОР-транскриптов, и их число было достаточно значительным: транскрипты ОР-рецепторов не были обнаружены в 22.2% незрелых нейронов и в 3.8% зрелых нейронов. Получается, что относительное содержание безрецепторных клеток очень высоко среди незрелых нейронов, затем их количество резко уменьшалось в популяции зрелых нейронов, но, тем не менее, их число там совпадает с числом мультирецепторных клеток. Среди незрелых нейронов безрецепторных клеток (12/54) было совсем незначительно меньше, чем мультирецепторных (13/54) или клеток с одним рецептором (17/54). Этот факт оставляет место для предположения, что выбор нейроном рецептора для экспрессии может происходить не только в процессе развития, но и на стадии зрелости. Сравнивая результаты трех независимых работ по исследованию транскриптомов одиночных клеток, нельзя также не заметить противоречие, связанное с обнаруженными межклеточными вариациями в транскрипционном уровне ОР-генов. Самый высокий уровень межклеточных вариаций обнаружен в [50]: разница в количестве ОР-транскриптов между нейронами достигает здесь трех порядков. В работе [11] разница в представленности ОР-транскриптов от клетки к клетке составляет не больше двух порядков. Хотя данные [11] свидетельствуют о том, что количество ОР-транскриптов неуклонно растет в процессе развития от ранних незрелых к поздним незрелым и затем к зрелым нейронам, тем не менее, во всех субпопуляциях есть существенные межклеточные вариации, и особенно они очевидны в зрелых нейронах. И, наконец, результаты, полученные в работе [43], показывают полное отсутствие межклеточных вариаций. В соответствии с правилом “один нейрон–один рецептор” в каждом зрелом нейроне представлены на очень высоком уровне транскрипты только одного ОР-гена. Необходимо отметить, что все существующие к настоящему времени доказательства молекулярной экспрессии обонятельных рецепторов в сенсорных нейронах были получены только на уровне транскриптов, но не на уровне рецепторного белка. До сих пор не разработаны методологические подходы, способные подтвердить, что в цилиях дендрита индиви-

дуального нейрона локализованы обонятельные рецепторы только одного типа.

### РОЛЬ ТРЕХМЕРНОЙ АРХИТЕКТУРЫ ГЕНОМА ОБОНЯТЕЛЬНОГО НЕЙРОНА В РЕАЛИЗАЦИИ ПРАВИЛА “ОДИН НЕЙРОН—ОДИН РЕЦЕПТОР”

Механизмы, определяющие выбор нейроном для экспрессии только одного ОР-гена в настоящее время являются предметом активных исследований. В частности, открытым остается вопрос, на какой стадии дифференцировки нейрона запускается активация выбранного ОР-гена, а также, каким образом в геноме достигается сайленсинг всех ОР-генов, кроме одного. Правило “один нейрон—один рецептор” является основой современных представлений о физиологических механизмах детекции и распознавания запахов. Однако вопрос об эпигенетических механизмах стохастической, моногенной и моноаллельной экспрессии ОР-генов долгое время оставался открытым. Работы последних лет показали, что в регуляцию экспрессии ОР-генов вовлечена пространственная архитектура генома обонятельного нейрона, движущей силой в формировании которой являются межхромосомные контакты.

Экспрессия генов высших эукариот осуществляется при участии регуляторных элементов энхансеров, способных активировать гены на больших расстояниях, достигающих миллиона пар оснований. Хорошо изучены специфические дистанционные цис-взаимодействия между энхансерами и промоторами, расположенными на одной хромосоме, за счет образования петли в хроматине. Топологию внутрихромосомных взаимодействий определяют хроматин-ассоциированные белковые комплексы. Что касается межхромосомных взаимодействий, то традиционно считалось, что они чрезвычайно редки, и их функциональное значение долгое время оставалось под вопросом. Обонятельные нейроны являются редким примером клеток, в которых дистанционные транс-взаимодействия в геноме играют ключевую роль в реализации программы экспрессии ОР-генов, определяющей функциональный фенотип клетки [22]. При исследовании пространственной структуры хроматина одиночных обонятельных нейронов в последние годы были использованы новые методы геномного секвенирования Hi-C [29] и Dip-C [51]. Известно, что в геноме мыши гены семейства ОР группируются в 60 кластерах, расположенных на 18 хромосомах. ОР-кластеры локализованы в участках конститутивного гетерохроматина. Большинство кластеров ассоциированы с группой обонятельных энхансеров, получивших название “Греческих островов” [25, 30]. В процессе дифференцировки нейрона сначала появляются цис-контакты меж-

ду различными ОР-кластерами, затем происходит дальнейшее усиление кластеризации за счет транс-взаимодействий [51]. В дифференцированных обонятельных нейронах кластеры ОР-генов дистанционно сближены за счет меж- и внутрихромосомных взаимодействий, образуя в трехмерной структуре генома эксклюзивные гетерохроматизированные компартменты, обеспечивающие сайленсинг ОР-генов. Межхромосомные контакты также способствуют сближению “Греческих островов” в отдельном геномном пространстве и формированию единого супер-энхансера, который, взаимодействуя с промотором только одного ОР-гена, запускает его активацию. Сборка и поддержание в геномном пространстве ОР-суперэнхансера и гетерохроматизированных ОР-компаментов, а также активация транскрипции только одного ОР-гена происходит при участии фактора транскрипции Lhx2 и адаптерного белка Ldb1, являющихся регуляторами дистанционных взаимодействий в геноме [29]. В предложенной модели остается непонятным, каким образом происходит снятие маркеров гетерохроматина и дерепрессия единственного гена, с промотором которого взаимодействует ОР-суперэнхансер. Однако данные о пространственной структуре хроматина показывают ключевую роль межхромосомного взаимодействия в механизмах эпигенетической регуляции экспрессии ОР-генов и реализации правила “один нейрон—один рецептор” на уровне генома обонятельного нейрона.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Концепция “один нейрон—один рецептор” является ключевой в физиологии обоняния. Значительные усилия последних лет в области молекулярной биологии и генетики обоняния были направлены на выяснение того, как в рамках этого правила в индивидуальных обонятельных нейронах может обеспечиваться моногенная и моноаллельная экспрессия генов обонятельных рецепторов. Высокотехнологичные методы исследования генома и транскриптома одиночной клетки были применены в последние годы с целью получения доказательств реализации принципа “один нейрон—один рецептор” в обонятельных нейронах. Была показана решающая роль межхромосомных взаимодействий в уникальной пространственной архитектуре генома обонятельного нейрона и расшифрованы некоторые аспекты эпигенетических механизмов сайленсинга многочисленных генов семейства обонятельных рецепторов. Результаты нескольких независимых работ по секвенированию транскриптомов одиночных нейронов оказались достаточно противоречивыми. Одна из работ полностью подтвердила правило, но в двух других были обнаружены мультирецепторные нейроны, существование которых авторы по-

пытались объяснить временной ко-экспрессией нескольких ОР-генов в процессе созревания клетки. Хотя данные транскриптомного анализа принципиально не противоречат концепции “один нейрон—один рецептор”, этот принцип еще не был верифицирован на уровне рецепторного белка, что представляется одной из ключевых проблем в обсуждаемой области.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 18-14-00347)

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Barrios A.W., Sánchez-Quintero P., Salazar I.* Dog and mouse: toward a balanced view of the mammalian olfactory system // *Front. Neuroanat.* 2014. V. 8. P. 106.
2. *Bleymehl K., Pérez-Gómez A., Omura M. et al* A sensor for low environmental oxygen in the mouse main olfactory epithelium // *Neuron.* 2016. V. 92. P. 1196–1203.
3. *Breer H., Fleischer J., Strotmann J.* The sense of smell: multiple olfactory subsystems // *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2006. V. 63 P. 1465–1475.
4. *Brennan P.A., Zufall F.* Pheromonal communication in vertebrates // *Nature.* 2006. V. 444. P. 308–315.
5. *Buck L., Axel R.* A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition // *Cell.* 1991. V. 65. P. 175–187.
6. *Dalton R.P., Lyons D.B., Lomvardas S.* Co-opting the unfolded protein response to elicit olfactory receptor feedback // *Cell.* 2013. V. 155. P. 321–332.
7. *Flegel C., Manteniotis S., Osthold S. et al* Expression profile of ectopic olfactory receptors determined by deep sequencing // *PLoS One.* 2013. V.8. P. e55368.
8. *Glusman G., Yanai I., Rubin I., Lancet D.* The complete human olfactory subgenome // *Genome. Res.* 2001. V. 11. P. 685–702.
9. *Gogos J.A., Osborne J., Nemes A. et al* Genetic ablation and restoration of the olfactory topographic map // *Cell.* 2000. V. 103. P. 609–620.
10. *Graziadei P.P., Monti Graziadei G.A.* Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons // *J. Neurocytol.* 1979. V.8. P. 1–18.
11. *Hanchate N.K., Kondoh K., Lu Z. et al* Single-cell transcriptomics reveals receptor transformations during olfactory neurogenesis // *Science.* 2015. V. 350. P. 1251–1255.
12. *Imai T., Sakano H., Vosshall L.B.* Topographic mapping—the olfactory system // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010. V. 2. P. a001776.
13. *Ishii T., Serizawa S., Kohda A. et al.* Monoallelic expression of the odorant receptor gene and axonal projection of olfactory sensory neurons // *Genes Cells.* 2001. V. 6. P. 71–78.
14. *Jiang Y., Matsunami H.* Mammalian odorant receptors: functional evolution and variation // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2015. V. 34. P. 54–60.
15. *Johnson M.A., Tsai L., Roy D.S. et al* Neurons expressing trace amine-associated receptors project to discrete glomeruli and constitute an olfactory subsystem // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 13410–13415.
16. *Kuhn M.* Molecular physiology of membrane guanylyl cyclase receptors // *Physiol. Rev.* 2016. V. 96. P. 751–804.
17. *Leinders-Zufall T., Cockerham R.E., Michalakis S. et al* Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 14507–14512.
18. *Lewcock J.W., Reed R.R.* A feedback mechanism regulates monoallelic odorant receptor expression // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 1069–1074.
19. *Li Q.* Deorphanization of olfactory trace amine-associated receptors // *Methods. Mol. Biol.* 2018. V. 1820. P. 21–31.
20. *Liberia T., Martin-Lopez E., Meller S.J., Greer C.A.* Sequential maturation of olfactory sensory neurons in the mature olfactory epithelium // *eNeuro.* 2019. V. 6. P. ENEURO.0266-19
21. *Liberles S.D.* Trace amine-associated receptors: ligands, neural circuits, and behaviors // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2015. V. 34. P. 1–7.
22. *Lomvardas S., Barnea G., Pisapia D.J. et al* Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice // *Cell.* 2006. V. 126. P. 403–13.
23. *Mackay-Sim A., Kittel P.W.* On the life span of olfactory receptor neurons // *Eur. J. Neurosci.* 1991. V. 3. P. 209–215.
24. *Malnic B., Hirono J., Sato T., Buck L.B.* Combinatorial receptor codes for odors // *Cell.* 1999. V. 96. P. 713–723.
25. *Markenscoff-Papadimitriou E., Allen W.E., Colquitt B.M. et al.* Enhancer interaction networks as a means for singular olfactory receptor expression // *Cell.* 2014. V. 159. P. 543–557.
26. *Moine F., Brechbühl J., Nenniger Tosato M. et al* Alarm pheromone and kairomone detection via bitter taste receptors in the mouse Grueneberg ganglion // *BMC Biol.* 2018. V. 16. P. 12.
27. *Mombaerts P.* Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor–one neuron hypothesis revisited // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2004. V. 14. P. 31–36.
28. *Mombaerts P.* Axonal wiring in the mouse olfactory system // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2006. V. 22. P. 713–737.
29. *Monahan K., Horta A., Lomvardas S.* LHX2- and LDB1-mediated trans interactions regulate olfactory receptor choice // *Nature.* 2019. V. 565. P. 448–453.
30. *Monahan K., Schieren J., Cheung J. et al.* Cooperative interactions enable singular olfactory receptor expression in mouse olfactory neurons // *Elife.* 2017. V. 21. P. 6.

31. *Morrison E.E., Costanzo R.M.* Morphology of olfactory epithelium in humans and other vertebrates // *Microscopy Research and Technique*. 1992. V. 23. P. 49–61.
32. *Moulton D.G.* Spatial patterning of response to odors in the peripheral olfactory system // *Physiol. Rev.* 1976. V. 56. P. 578–593.
33. *Munger S.D., Leinders-Zufall T., McDougall L.M. et al* An olfactory subsystem that detects carbon disulfide and mediates food-related social learning // *Curr. Biol.* 2010. V. 20. P. 1438–1444.
34. *Nakamura T., Gold G.H.* A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia // *Nature*. 1987. V. 325. P. 442–444.
35. *Narusuye K., Kawai F., Miyachi E.-I.* Spike encoding of olfactory receptor cells // *Neuroscience Research*. 2003. V. 46. P. 407–413.
36. *Niimura Y., Matsui A., Touhara K.* Extreme expansion of the olfactory receptor gene repertoire in African elephants and evolutionary dynamics of orthologous gene groups in 13 placental mammals // *Genome Res.* 2014. V. 24. P. 1485–1496.
37. *Niimura Y., Nei M.* Extensive gains and losses of olfactory receptor genes in mammalian evolution // *PLoS One*. 2007. V. 2. P. e708.
38. *Omura M., Mombaerts P.* Trpc2-expressing sensory neurons in the main olfactory epithelium of the mouse // *Cell Rep.* 2014. V. 8. P. 583–595.
39. *Omura M., Mombaerts P.* Trpc2-expressing sensory neurons in the mouse main olfactory epithelium of type B express the soluble guanylate cyclase Gucylb2 // *Mol. Cell. Neurosci.* 2015. V. 6. P. 114–124.
40. *Pifferi S., Cenedese V., Menini A.* Anoctamin2/TMEM16B: a calcium-activated chloride channel in olfactory transduction // *Esp. Physiol.* 2001. V. 97. P. 193–199.
41. *Ressler K.J., Sullivan S.L., Buck L.B.* A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium // *Cell*. 1993. V. 73. P. 597–609.
42. *Ressler K.J., Sullivan S.L., Buck L.B.* Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb // *Cell*. 1994. V. 79. P. 1245–1255.
43. *Saraiva L.R., Ibarra-Soria X., Khan K. et al.* Hierarchical deconstruction of mouse olfactory sensory neurons: from whole mucosa to single-cell RNA-seq // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 18178.
44. *Schwob J.E., Jang W., Holbrook E.H. et al* Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poietic license // *J. Comp. Neurol.* 2017. V. 525. P. 1034–1054.
45. *Schultz E.* Repair of the olfactory mucosa with special reference to regeneration of olfactory cells (sensory neurons) // *Am. J. Pathol.* 1960. V. 37. P. 1–19.
46. *Serizawa S., Miyamichi K., Nakatani H. et al* Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse // *Science*. 2003. V. 302. P. 2088–2094.
47. *Serizawa S., Miyamichi K., Sakano H.* One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system // *Trends Genet.* 2004. V. 20. P. 648–653.
48. *Shykind B.M., Rohani S.C., O'Donnell S. et al.* Gene switching and the stability of odorant receptor gene choice // *Cell*. 2004. V. 117. P. 801–815.
49. *Smith C.G.* Regeneration of sensory olfactory epithelium and nerves in adult frogs // *Anat. Rec.* 1951. V. 109. P. 661–671.
50. *Tan L., Li Q., Xie X.S.* Olfactory sensory neurons transiently express multiple olfactory receptors during development // *Mol. Syst. Biol.* 2015. V. 11. P. 844.
51. *Tan L., Xing D., Daley N., Xie X.S.* Three-dimensional genome structures of single sensory neurons in mouse visual and olfactory systems // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2019. V. 26. P. 297–307.
52. *Vassar R., Chao S.K., Sitcheran R.* Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb // *Cell*. 1994. V. 79. P. 981–991.
53. *Vassar R., Ngai J., Axel R.* Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium // *Cell*. 1993. V. 74. P. 309–318.
54. *Youngentob S.L., Kent P.F., Margolis F.L.* OMP gene deletion results in an alteration in odorant-induced mucosal activity patterns // *J. Neurophysiol.* 2003. V. 90. P. 3864–3873.
55. *Zhang X., Zhang X., Firestein S.* Comparative genomics of odorant- and pheromone receptor genes in rodents // *Genomics*. 2007. V. 89. P. 441–450.
56. *Zheng J., Zagotta W.N.* Stoichiometry and assembly of olfactory cyclic nucleotide-gated channels // *Neuron*. 2004. V. 42. P. 411–421.

## One Receptor–One Neuron Rule in the Physiology and Genetics of Olfaction

M. F. Bystrova<sup>1,\*</sup> and S. S. Kolesnikov<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Cell Biophysics RAS, Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Pushchino, 142290 Russia*

\*e-mail: [marinabystrova@rambler.ru](mailto:marinabystrova@rambler.ru)

\*\*e-mail: [staskolesnikov@yahoo.com](mailto:staskolesnikov@yahoo.com)

The ability of olfactory system to detect and recognize a vast variety of odors is mediated by olfactory receptors, which constitute the largest family in mammalian genomes. Each olfactory sensory neuron randomly

expresses a single olfactory receptor gene from a large gene repertoire in a monoallelic manner. This phenomenon called the “one-neuron–one-receptor” rule is central to the physiology of olfactory perception and current models of olfactory information processing and coding. Here we review recent advances in single cell transcriptomic profiling of olfactory neurons with a particular focus on validating the rule. Single-cell RNA sequencing of mature olfactory neurons and neurons assigned to different developmental stages yielded contradictory results. Particularly, multi-receptor neurons were discovered in two independent studies, while results of one study entirely confirmed the rule. Mechanisms regulating OR gene choice remain unclear up to the present day. Emerging evidence indicates the role of inter-chromosomal interactions in the formation of super-enhancer and the specific olfactory receptor compartments, which are involved in the maintenance of the “one-neuron–one-receptor” rule.

**Keywords:** olfactory neuron, olfactory receptor, neurogenesis, olfactory coding, single cell, sc-RNA-seq  
This study was supported by the Russian Science Foundation (grant 18-14-00347)