

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA “ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”



MODELAMIENTO DE LA ESTRUCTURA 3D DE LAS VARIANTES POLIMÓRFICAS DE
LOS OR CANINOS EN COMPLEJO CON ODORANTES ESPECÍFICOS EN RAZAS CON
BUENA CAPACIDAD DE DETECCIÓN DE DROGAS Y EXPLOSIVOS

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OBTENER EL GRADO DE BACHILLER
EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA

AUTORA:

JESÚS ALEXANDRA DURAND CALLE

ASESORA:

CLAUDIA INES GLORIA MACHICADO RIVERO, PhD.

LIMA - PERÚ

2021

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	3
ABSTRACT.....	5
1. ESTADO DEL ARTE	7
1.1. OLFACCIÓN CANINA.....	7
1.2. CARACTERÍSTICAS DE OR CANINOS	9
1.3. RELACIÓN ENTRE GENES OR Y CAPACIDAD DE DETECCIÓN CANINA.....	11
1.4. MODELAMIENTO MOLECULAR DE PROTEÍNAS Y COMPLEJOS.	13
2. PROBLEMA DE INVESTIGACION	15
3. ESTRATEGIA DE ABORDAJE	17
REFERENCIAS.....	19

RESUMEN

El sentido del olfato de los mamíferos detecta una gran variedad de compuestos transportados por el aire, denominados odorantes, para satisfacer necesidades básicas como alimentación, sobrevivencia y reproducción. El perro es uno de los mamíferos con una extraordinaria capacidad olfativa, la cual varía entre razas siendo el pastor alemán y el labrador retriever aquellas reconocidas por poseer una destacada capacidad de detección. Es por ello que los canes suelen emplearse en la detección de sustancias y enfermedades porque los niveles de sensibilidad son superiores a los de cualquier tecnología desarrollada hasta el momento y los límites inferiores de detección son muy bajos.

En general, la percepción de odorantes inicia con su interacción con los receptores olfativos OR asociados a proteínas G y embebidos en los cilios de la membrana del neuroepitelio olfatorio. En perros, la familia de los ORs está codificada por 1 094 genes que contienen una gran cantidad de polimorfismos, siendo el 50% de un solo nucleótido (SNP) de tipo no silencioso. Se ha reportado que ciertos SNPs no silenciosos específicos de razas especialistas en detección de drogas y explosivos se relacionan con la habilidad de detectar dichos olores.

Sin embargo, aún no se conoce cuál es el efecto de estos SNPs en la estructura 3D de los OR cuando se encuentra en complejo con odorantes de drogas y explosivos específicos. El estudio de estas proteínas es retador porque su estructura aún no se ha resuelto experimentalmente. Como alternativa, se han aplicado aproximaciones teóricas para predecirla; en OR de humanos, ratas y ratones se ha hecho satisfactoriamente, pero en canes aún no se ha realizado.

El presente trabajo busca predecir la estructura 3D de variantes polimórficas de OR caninos en complejo con odorantes contenidos en drogas y explosivos. Dichas variantes son aquellas relacionados a una mejor o peor capacidad de detección canina de drogas y explosivos. Los resultados describirían por primera vez la estructura 3D de OR caninos y de sus complejos con odorantes específicos, aplicando métodos bioinformáticos.

Palabras clave: Modelamiento, receptor olfativo, polimorfismo, detección, odorante.

ABSTRACT

The mammalian olfaction detects various compounds transported by air, called odorants, to satisfy essential needs such as feeding, reproduction, and survival. Dogs are one of the mammals' species with an extraordinary olfaction capacity, which varies between breeds, being both German Shepherd and Labrador Retriever species known for their excellent detection capacity. This capacity consists of superior sensitivity levels and lower detection limits compared to any other technology developed so far, which is the reason for dog employment for substances and human disease detection.

Overall, odorant perception initiates with their interaction with olfactory receptors (OR), G-proteins coupled receptors located in the olfactory neuroepithelium ciliary membrane. In dogs, the OR family is codified by 1'094 polymorphic genes, of which 50% are non-synonymous SNPs. It has been reported that some non-synonymous SNPs specific for drugs and explosive detection breeds are correlated with their capability to detect those substances. Studying OR proteins is very challenging given that there is no available solved structure yet. As an alternative, theoretical approximations have been used as a way to predict their structure. Some human, rat, and mouse ORs have been successfully modeled, but canine ORs have not been until now.

The present work seeks to predict the 3D structure of specific canine OR SNPs when forming a complex with drugs and explosives odorants. Those variants have been correlated with a better or worse capability of drugs and explosives canine detection. The results will describe for the first time the canine 3D OR structure and their complexes with specific odorants by using bioinformatic methods.

Keywords: Modeling, olfactory receptor, polymorphism, detection, odorant.

1. ESTADO DEL ARTE

1.1. Olfacción canina

El sentido del olfato permite detectar y reconocer olores para satisfacer necesidades básicas como alimentación, reproducción y supervivencia, haciéndolo indispensable para el desempeño normal del animal (1). Existen algunas especies que poseen un extraordinario sentido del olfato, entre las que destaca el perro por su gran sensibilidad en la detección de olores a concentraciones muy bajas como una parte por trillón (2). Es por eso que los canes se emplean como herramienta en la búsqueda de personas, detección de sustancias y de enfermedades, siendo más sensibles que las tecnologías disponibles actualmente (2-4).

En general, la identificación de olores se produce por la interacción de proteínas del sistema olfatorio, denominadas receptores olfativos, con compuestos transportados por el aire, denominados odorantes (5). Esta identificación es compleja y sigue un código combinatorial en el que un solo receptor reconoce varios tipos de odorantes, o bien un solo odorante es reconocido por varios tipos de receptores, siendo diferentes de aquellos receptores ligando-específico (5). Asimismo, muchos odorantes pueden interactuar con un receptor al mismo tiempo y con distintas afinidades (6,7). A ello se suma que los odorantes poseen propiedades físicas y químicas variables, las cuales pueden cambiar dependiendo de las características ambientales (8).

Los receptores olfativos son una superfamilia de receptores asociados a proteínas G (GPCR), los cuales se diferencian por su estructura, tipo de ligando y localización en los distintos compartimentos nasales (9). Particularmente, el receptor de tipo OR se encarga del reconocimiento de compuestos volátiles en el epitelio olfatorio de los mamíferos (2). La subfamilia de OR es la más numerosa y diversa: en mamíferos se han registrado, en promedio, cerca de 1 259 tipos de OR (9).

Los OR caninos se encuentran embebidos en la membrana de los cilios del epitelio olfatorio ubicado en la cavidad nasal. Este se caracteriza por ser un neuroepitelio compuesto por millones de células de receptores olfativos (ORC), que, por un lado, poseen cientos de cilios y, por el otro, tienen proyecciones al bulbo olfatorio. Cada ORC expresa un tipo de OR generando aproximadamente 220 millones de ORs en la cavidad nasal canina permitiendo así el reconocimiento de una enorme cantidad de odorantes. Los odorantes ingresan por la nariz a esta cavidad y se unen a los receptores del neuroepitelio en el que se desencadena la activación de la proteína G. Esto genera señales eléctricas que son llevadas, primero al bulbo olfatorio, y luego a otras regiones cerebrales para su traducción en una respuesta. (2)

Se sugiere que una mejor capacidad olfativa canina se caracteriza por una numerosa cantidad de ORCs, un gran tamaño del epitelio olfatorio y una eficiente transducción de la señal eléctrica. A nivel genético la fina percepción olfativa de los canes se asocia con ciertas características de los OR incluyendo una gran diversidad genética, un alto nivel de polimorfismo y una alta proporción de genes funcionales respecto a pseudogenes (10). Si bien no se ha determinado un número aproximado de odorantes que los canes pueden

detectar, se sabe que su capacidad de detección es entre 10 000 a 100 000 veces superior al humano promedio, pudiendo este discriminar hasta un trillón de moléculas odorantes (2,11).

1.2. Características de OR caninos

Los receptores olfativos OR caninos se encuentran codificados por los genes OR, que representan la subfamilia más grande de genes GPCR (12). Se componen de una región codante sin intrones de aproximadamente 1 kb, precedida de hasta 4 exones no codantes en la región upstream que, por splicing alternativo, pueden generar varias isoformas (13,14). De esta forma, cada gen mide aproximadamente entre 1 a 11 kb y codifica a un determinado tipo de receptor expresado, a su vez, por solo una ORC (13).

Existen dos grandes clases de genes OR: clase I y clase II, siendo esta última la que codifica una gran diversidad de receptores especializados en la detección de compuestos hidrofóbicos o volátiles (9). Ambas clases se encuentran distribuidas en todo el genoma canino agrupados en 49 clusters y en un número muy variable en 24 de los 39 cromosomas (13,15). Así, hay 856 genes OR intactos y potencialmente activos, así como 238 pseudogenes, superando en cantidad al humano, aunque no al ratón (16). De esta forma, existen 1'094 genes OR caninos que se caracterizan por un alto nivel de polimorfismos, los cuales permitirían detectar una amplia gama de compuestos (10).

Los polimorfismos encontrados son de tres tipos: de nucleótido único (SNP), inserciones y deleciones (indels) y variación en el número de copias (CNV) (10), siendo el de tipo SNP el más estudiado. Los SNPs se caracterizan por distribuirse a lo largo de toda la

secuencia genética, así como por encontrarse en un número variable entre genes y entre razas, siendo ciertos SNPs específicos de algunas razas caninas (10). El tipo de SNP más frecuente es no silencioso, el cual representa más del 50% del total de SNPs en genes OR y conlleva a un cambio a un aminoácido de un grupo químico diferente (10). Generalmente, estos se ubican en toda la proteína afectando aminoácidos variables o muy variables (16,17).

Los genes OR caninos codifican proteínas GPCR de clase A, las cuales tienen una longitud aproximada de 320 ± 25 aminoácidos y están compuestas de 9 dominios: un dominio extracelular, uno intracelular y 7 transmembrana (TM1-TM7) (18). Estas proteínas poseen ciertas características comunes entre GPCRs, como son los 7 dominios transmembrana hidrofóbicos entre 19 a 26 aminoácidos cada uno, un sitio de glicosilación conservado en el extremo N-terminal del dominio extracelular y un puente disulfuro entre cisteínas de los loops 1 y 2 del dominio extracelular. Por otro lado, ciertas características la identifican como receptor olfatorio entre las que destacan un loop 2 muy largo y dos cisteínas en el dominio extracelular, así como motivos conservados en loop intracelular y TM 3, 5, 6 y 7. (14,18)

El sitio de unión de estas proteínas se encuentra en los dominios transmembrana específicamente en TM3, TM5 y TM6, lo cual se dedujo primero de la gran variabilidad de los dominios transmembrana respecto a los demás y se confirmó con estudios bioinformáticos y de mutagénesis dirigida en determinados casos (18). Respecto a los niveles de conservación de los OR, estos varían dependiendo de la posición del

aminoácido en la proteína, cuyo porcentaje de identidad, tras comparar 1'009 OR caninos, va desde 30% hasta 90% (15).

1.3. Relación entre genes OR y capacidad de detección canina

Los genes contienen la información necesaria para dar lugar a proteínas con características estructurales particulares. Poseen una topología, plegamiento, estabilidad y modificaciones post traduccionales únicas, que les permite ejecutar una función determinada. Así, cambios en su secuencia génica pueden conllevar a cambios en su estructura, los cuales a su vez pueden afectar la función proteica.

Específicamente en OR, la función se ha dilucidado por estudios funcionales de activación de células heterólogas que expresan OR, así como por análisis con ligandos a distintas concentraciones y por estudios de interacción de OR con muchos ligandos (19). Todos se han realizado únicamente en OR de humanos, ratas y ratones (20), a excepción de dos estudios funcionales que descubrieron pares de OR caninos con su respectivo ligando (21,22). A través de estos análisis, se ha evaluado que variaciones en la secuencia génica de OR ocasionan diferencias significativas en la función (23). Por ejemplo, se ha reportado una correlación entre SNPs de OR humanos y las actividades in vitro de los receptores, así como con la percepción del olor (20). Además, un análisis funcional en un sistema de expresión heterólogo reveló que el 63% de la variación genética de 27 OR humanos alteraba su función in vitro (24).

Asimismo, la variabilidad funcional de los receptores como producto de la variación genética, se ha relacionado numerosas veces con diferencias en la percepción a determinados olores. El primer artículo en abordar lo mencionado reportó que la variación genética del receptor humano OR7D4 explica un gran porcentaje de la percepción reducida de la intensidad y el agrado de dos odorantes esteroideos (25). Incluso hay estudios de gran escala que, al evaluar esta relación para una gran cantidad de ORs humanos, encuentran que el genotipo de cada gen contribuyó significativamente a una percepción olfativa diferente para una gran diversidad de odorantes (26).

Si bien es necesario hacer análisis funcionales para comprobar la relación genes-función-percepción, es muy complicado realizarlos en perros por la dificultad que supone la expresión de OR en células heterólogas, así como por la imposibilidad de cuantificar la percepción (19). Además, evaluar la expresión de ORs caninos in vivo conlleva a dificultades en la recuperación total del epitelio olfatorio, así como a serios problemas éticos (10,27). Es por ello que únicamente se ha registrado una relación entre genes-percepción, la cual ha sido abordada en pocos estudios (28–30).

Lesniak, et al (2008) estableció que dos SNPs en dos de los cinco genes evaluados (cOR1P2 y cOR52P3) se asociaron significativamente con una mejor capacidad de detección de drogas y explosivos de perros pastor alemán y labrador retriever (28). Sacharczuk et al (2019) evaluó los mismos genes, pero distintos SNPs los cuales tuvieron un efecto significativo en la capacidad de detección de drogas y explosivos de perros pastor alemán y labrador retriever (30). Además, Yang, et al (2016) halló una asociación significativa de 5 SNPs de 3 genes sobre la capacidad de detección de perros pastor

alemán (29). Así, se concluye que hay una relación evidente entre ciertas variantes genéticas y la capacidad de detección de perros, la cual necesita más exploración.

1.4. Modelamiento molecular de proteínas y complejos.

El modelamiento molecular es una técnica que emplea matemática, física y ciencias de la computadora para estudiar moléculas y sistemas. Dentro de la investigación de sistemas biológicos, se estudia a las moléculas responsables de ejecutar funciones, entre las que destacan las proteínas. De estas se puede modelar su estructura 3D, así como sus complejos con ligandos. El conocimiento obtenido ayuda a diseñar experimentos y análisis que conduzcan a mejorar la comprensión de la dinámica y función macromolecular. El modelamiento molecular posee muchas ventajas entre las que destacan su bajo costo, facilidad de ejecución en comparación con otras técnicas como los métodos biofísicos de difracción de rayos X o resonancia magnética nuclear (NMR). (31)

El modelamiento de proteínas se emplea para predecir su estructura 3D a partir de su secuencia de aminoácidos. Esta técnica reconstruye atómicamente la conformación nativa de la proteína de interés y representa la única forma de adquirir conocimiento de la estructura proteica cuando no se cuentan con métodos experimentales. Un tipo de modelamiento, conocido como modelamiento por homología, usa las coordenadas 3D de una proteína resuelta experimentalmente como plantilla para predecir la estructura de una proteína similar en secuencia, conocida como homóloga. Se basa en el supuesto de que proteínas homólogas, con secuencias parecidas, poseen un plegamiento similar. (32)

El modelamiento de OR por homología es de especial significancia porque su estructura 3D aún no se obtiene experimentalmente por métodos biofísicos (33). Es por eso que se emplean GPCRs resueltos experimentalmente con un alto nivel de identidad de secuencia (33). Así, se ha modelado satisfactoriamente OR de humanos, ratas y ratones (20), pero aún no se realizan modelos en canes.

Por otro lado, el modelamiento del complejo proteína-ligando se le conoce como docking molecular. Es una técnica que predice cómo una proteína interactúa, a nivel atómico, con ciertos compuestos, lo que permite caracterizar el comportamiento de moléculas pequeñas en el sitio de unión de la proteína y clarificar procesos bioquímicos fundamentales. El docking molecular aplica fórmulas de mecánica o dinámica molecular para modelar complejos de los que se puede describir sus interacciones intermoleculares proteína-ligando y conocer la energía de interacción teórica, otorgando una idea de la afinidad de las moléculas investigadas. (34)

El docking molecular se ha empleado en estudios de interacción de ORs con ciertos ligandos en humanos, ratas y ratones (20). La mayoría de estos estudios enfrentan ligandos que se han reportado previamente que activan los OR. Otros trabajan conjuntamente con estudios experimentales para desarrollar modelos in silico de forma que ayude a dilucidar la función del receptor o a responder preguntas sobre la biología de los receptores (20). Actualmente, se realizan estudios de screening masivo in silico en los que enfrentan una gran cantidad de posibles ligandos a un receptor. Este tipo de estudios se ha convertido en una técnica importante en el diseño de nuevos fármacos (7,33).

2. PROBLEMA DE INVESTIGACION

Los receptores olfativos (OR) caninos, encargados de detectar odorantes, son codificados por genes muy polimórficos que contienen una gran cantidad de polimorfismos de nucleótido único (SNP) (5,10). Del total de SNPs, más del 50% son no silenciosos siendo algunos de ellos específicos de razas y asociados con una capacidad diferencial de detección de olores (10,28–30). Por ejemplo, Lesniak et al (2008) y Sacharczuk et al (2019) reportaron que la transición del gen cOR9S13 en el locus 592 se relaciona con un aumento en el desempeño en la detección de drogas y explosivos por perros pastor alemán y labrador retriever (28,30). Esto sugiere que una variante genética resulta en un cambio en la secuencia aminoacídica capaz de alterar la función del receptor y, con ello, la capacidad olfativa canina.

Los SNPs no silenciosos se han caracterizado genéticamente en razas de perro especialistas en detección (16), pero aún no se ha estudiado su efecto en la estructura 3D de los receptores ni cómo ello impacta en su interacción con odorantes contenidos en determinadas drogas y explosivos. La información sobre la conformación 3D de OR polimórficos es limitada: el análisis de la estructura secundaria de los genes OR caninos muestra que hay sitios conservados y variables en dominios específicos (17). Es por ello que este estudio busca predecir el efecto de los SNPs no silenciosos reportados en razas con diferente desempeño en la detección de drogas y explosivos sobre la estructura proteica de los OR caninos en presencia de los odorantes de dichas sustancias.

La estructura de los receptores olfativos aún no se ha resuelto experimentalmente, por lo que solo se cuenta con modelos teóricos de humanos, ratas y ratones (20). Así, el estudio propuesto representaría uno de los primeros en generar modelos tanto de la estructura 3D de

OR caninos, así como de sus complejos con odorantes contenidos en drogas y explosivos. De esta forma, se explorará el efecto sobre la estructura 3D proteica ocasionada por variantes genéticas relacionadas a una mejor o peor capacidad de detección canina de sustancias.

3. ESTRATEGIA DE ABORDAJE

El abordaje experimental consiste en dos fases principales: la primera es el modelamiento de la estructura 3D de las variantes polimórficas de OR caninos asociadas a una diferente capacidad de detección, y la segunda es el docking molecular de estos modelos con odorantes contenidos en drogas y explosivos. Para ello, se necesitan las secuencias aminoacídicas de las variantes polimórficas, los scores de desempeño de detección de odorantes y las sustancias empleadas en la detección canina. Las secuencias se obtendrán del genoma anotado de perro y se modificarán añadiendo individualmente el cambio aminoacídico, precisado en (28–30). Por su parte, los scores y los compuestos en las sustancias empleadas se obtendrán de los artículos mencionados. Estos últimos son metanfetamina, anfetamina, cocaína, marihuana; y trinitrotolueno, semtex, dinamita, cuyas estructuras 3D se descargarán de PubChem.

Como paso previo al modelamiento, se predecirá el impacto de las variantes genéticas en la topología y plegamiento con las herramientas HMMTOP y TopCons, así como en las modificaciones postraduccionales de los ORs empleando Expasy y DTU bioinformatics. Se conducirá un estudio del impacto funcional de los SNPs en los ORs utilizando PROVEAN. Finalmente se estimará el cambio de estabilidad ocasionado por las variantes aminoacídicas en los ORs empleando una máquina de vector de soporte con i-Mutant.

La primera fase consistirá en el modelamiento por homología de los polipéptidos de referencia y de sus variantes polimórficas empleando el programa Phyre-2. Las estructuras se visualizarán con el programa Chimera y se compararán las estructuras de cada OR sin SNPs con las variantes polimórficas, midiendo el rmsd. En la segunda fase, se aplicará una

rutina de docking molecular basada en screening masivo de los modelos generados con los componentes de las sustancias de interés. A su vez, esta última fase tiene 3 etapas, las cuales se ejecutarán con el programa Autodock. La primera es un screening virtual entre cada OR y sus variantes con los compuestos de estudio. La mayoría de estos tienen isómeros que serán considerados en el screening. De este, se obtendrá un ranking de los compuestos que mejor se unen a cada OR, lo cual conlleva a la segunda etapa: escoger los 5 primeros lugares. Finalmente, la tercera etapa es el docking molecular en la que se evaluará la interacción de cada compuesto con cada OR. En función de la energética de la unión OR-ligandos, se determinará el impacto de las variantes sobre la unión a los ligandos de estudio.

REFERENCIAS

1. Spehr M, Munger SD. Olfactory receptors: G protein-coupled receptors and beyond. *J Neurochem*. 2009 Jun 1;109(6):1570–83. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.2009.06085.x>
2. Jenkins EK, DeChant MT, Perry EB. When the nose doesn't know: Canine olfactory function associated with health, management, and potential links to microbiota. *Front Vet Sci*. 2018;5(MAR).
3. Hepper P, Wells D. Olfaction in the Order Carnivora: Family Canidae. *Handb Olfaction Gustation Third Ed*. 2015;591–604.
4. Brooks SW, Moore DR, Marzouk EB, Glenn FR, Hallock RM. Canine Olfaction and Electronic Nose Detection of Volatile Organic Compounds in the Detection of Cancer: A Review. *Cancer Invest*. 2015;33(9):411–9.
5. Ache BW, Young JM. Olfaction: Diverse species, conserved principles. *Neuron*. 2005;48(3):417–30.
6. Singh V, Murphy NR, Balasubramanian V, Mainland JD. Competitive binding predicts nonlinear responses of olfactory receptors to complex mixtures. 2019; Available from: www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1813230116/-/DCSupplemental. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1813230116
7. Harini K, Sowdhamini R. Computational approaches for decoding select odorant-olfactory receptor interactions using mini-virtual screening. *PLoS One*.

- 2015;10(7):1–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0131077>
8. Pannunzi M, Nowotny T. Odor Stimuli: Not Just Chemical Identity. *Front Physiol.* 2019;10(November):1–20.
 9. Hayden S, Teeling EC. The Molecular Biology of Vertebrate Olfaction. *Anat Rec.* 2014;297(11):2216–26.
 10. Quignon P, Rimbault M, Robin S, Galibert F. Genetics of canine olfaction and receptor diversity. *Mamm Genome.* 2012;23(1–2):132–43.
 11. Gerkin RC, Castro JB. The number of olfactory stimuli that humans can discriminate is still unknown. *Elife.* 2015;4(JULY 2015):1–15.
 12. Kramer IJM. Sensory Signal Processing; Visual Transduction and Olfaction. *Signal Transduction.* 2016. 329–379 p.
 13. Touhara K. Olfactory Receptors. *Encycl Neurosci.* 2009;163–9.
 14. Gaillard I, Rouquier S, Giorgi D. Olfactory receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(4):456–69.
 15. Quignon P, Giraud M, Rimbault M, Lavigne P, Tacher S, Morin E, et al. The dog and rat olfactory receptor repertoires. *Genome Biol.* 2005 Sep 28;6(10):R83. Available from: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2005-6-10-r83>
 16. Galibert F, Azzouzi N, Quignon P, Chaudieu G. The genetics of canine olfaction. *J Vet Behav Clin Appl Res.* 2016;16:86–93. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jveb.2016.06.012>

17. Tacher S, Quignon P, Rimbault M, Dreano S, Andre C, Galibert F. Olfactory receptor sequence polymorphism within and between breeds of dogs. *J Hered.* 2005;96(7):812–6.
18. Fleischer J, Breer H, Strotmann J. Mammalian olfactory receptors. *Front Cell Neurosci.* 2009;3(AUG):1–10.
19. Ho J. *Explorations in Olfactory Receptor Structure and Function.* Duke; 2014.
20. Peterlin Z, Firestein S, Rogers ME. The state of the art of odorant receptor deorphanization: A report from the orphanage. *J Gen Physiol.* 2014;143(5):527–42.
21. Benbernou N, Tacher S, Phanie Robin S, Rakotomanga M, Senger F, Galibert F. Functional Analysis of a Subset of Canine Olfactory Receptor Genes. *J Hered.* 2007;(5):500–5. Available from: <https://academic.oup.com/jhered/article-abstract/98/5/500/2188580>
22. Benbernou N, Robin S, Tacher S, Rimbault M, Rakotomanga M, Galibert F. cAMP and IP3 Signaling Pathways in HEK293 Cells Transfected with Canine Olfactory Receptor Genes. *J Hered.* 2011;102(Suppl_1):S47–61.
23. Jiang Y, Matsunami H. Mammalian odorant receptors: Functional evolution and variation. *Curr Opin Neurobiol.* 2015;34(Table 1):54–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.014>
24. Mainland JD, Keller A, Li YR, Zhou T, Trimmer C, Snyder LL, et al. The missense of smell: Functional variability in the human odorant receptor repertoire. *Nat*

- Neurosci. 2014;17(1):114–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3598>
25. Keller A, Zhuang H, Chi Q, Vosshall LB, Matsunami H. Genetic variation in a human odorant receptor alters odour perception. *Nature*. 2007;449(7161):468–72.
 26. Trimmer C, Keller A, Murphy NR, Snyder LL, Willer JR, Nagai MH, et al. Genetic variation across the human olfactory receptor repertoire alters odor perception. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(19):9475–80.
 27. Galibert F, André C. The dog: A powerful model for studying genotype-phenotype relationships. *Comp Biochem Physiol - Part D Genomics Proteomics*. 2008;3(1):67–77.
 28. Lesniak A, Walczak M, Jezierski T, Sacharczuk M, Gawkowski M, Jaszczak K. Canine olfactory receptor gene polymorphism and its relation to odor detection performance by sniffer dogs. *J Hered*. 2008;99(5):518–27.
 29. Yang M, Geng GJ, Zhang W, Cui L, Zhang HX, Zheng JL. SNP genotypes of olfactory receptor genes associated with olfactory ability in German Shepherd dogs. *Anim Genet*. 2016;47(2):240–4.
 30. Sacharczuk M, Walczak M, Adamkiewicz E, Walasek A, Ensminger J, Presch M, et al. Polymorphism of olfactory and neurotransmitters receptor genes in drug and explosives detection dogs can be associated with differences in detection performance. *Appl Anim Behav Sci*. 2019;215(April):52–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2019.04.006>
 31. Gáspári Z, Perczel A. Protein Dynamics as Reported by NMR. Vol. 71, Annual

Reports on NMR Spectroscopy. 2010. 35–75 p. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080890548000022>

32. Robinson SW, Afzal AM, Leader DP. Bioinformatics: Concepts, Methods, and Data. In: Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine. Elsevier Inc.; 2014. p. 259–87. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012386882400013X>
33. Launay G, Sanz G, Pajot-Augy E, Gibrat JF. Modeling of mammalian olfactory receptors and docking of odorants. *Biophys Rev.* 2012;4(3):255–69.
34. Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. Vol. 7, Current computer-aided drug design. NIH Public Access; 2011. Available from: [/pmc/articles/PMC3151162/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2151162/)