

Silke Argo: Odorant Receptor Gene Regulation in the Zebrafish, *Danio rerio* - an analysis of endogenous and Reporter Gene expression. 2002

Der Geruchssinn ermöglicht es einem Organismus, lebenswichtige Information aus der Geruchszusammensetzung seiner Umwelt zu extrahieren. Jedes olfaktorische Rezeptorneuron meistert dabei die anspruchsvolle Aufgabe, ein Geruchsrezeptorgen (Odorant Rezeptor Gen, OR-Gen) aus dem enormen Repertoire von 100 OR-Genen des Fisches bzw. 1000 OR-Genen der Mammalia zu selektieren. Der Kontrollmechanismus, der diese hoch differentielle Genexpression ermöglicht, ist bisher weitgehend ungeklärt.

Die vorliegende Studie hat es sich zur Aufgabe gemacht, die Regulation der Geruchsrezeptorexpression durch Analyse mehrerer Parameter der Geruchsrezeptorgene eines mikrosmaten Vertebraten, des Zebraärbblings, *Danio rerio*, zu untersuchen. Die endogene Expression von elf Geruchsrezeptorgenen des Zebraärbblings (ZOR-Genen) wurde während der embryonalen und larvalen Entwicklung mittels in situ Hybridisierungsanalyse untersucht. Dies zeigte, dass die Expression in einer stereotypen zeitlichen Abfolge in vier Gruppen von Genen innerhalb der ersten drei Tage nach der Fertilisation beginnt. Eine quantitative Analyse der embryonalen Expressionsdynamik ergab, dass die Expression der Gene innerhalb dieser Gruppen signifikant stärker gekoppelt war als zwischen den Gruppen. Dies weist darauf hin, dass die verschiedenen Gruppen von unabhängigen regulatorischen Mechanismen gesteuert werden. Die Frequenz der Expression steigt während der Embryogenese sehr langsam, was darauf hindeutet, dass die ZOR-Gene durch einen stochastischen Mechanismus für die Expression selektiert werden. Der zeitliche Verlauf der Expression der individuellen Gene differierte während der Larvalentwicklung, was vermutlich zusätzliche regulatorische Einflüsse reflektiert. Die genomische Anordnung der ZOR-Gene wurde durch eine Kopplungsanalyse und den Screen einer Bibliothek genomischer Zebrafisch-DNA untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass zehn der elf Gene in einem großen Cluster gekoppelt sind. Des Weiteren wurde gefunden, dass die Gene einer Gruppe eng benachbart liegen. Diese genomische Anordnung könnte es einem gemeinsamen Transkriptionsapparat erleichtern, eine bestimmte Gruppe von Genen aus dem großen Repertoire anzusteuern. Die Funktionalität möglicher Promotorregionen von zwei ZOR-Genen wurde in Bezug auf ihre Fähigkeit untersucht, die Expression eines grün fluoreszierenden Proteins zu erzielen. Hierzu wurden Reporter-genkonstrukte in Zebraärbblingsembryonen des Ein- bis Zweizellstadiums injiziert. Die Untersuchung der Transgenexpression in lebenden Zebraärbblingsembryonen und -larven zeigte, dass cis-regulatorische Elemente in weniger als 0,3 kb und 1,3 kb des Promotors des jeweiligen ZOR-Gens ausreichten, um mehrere Charakteristika der Geruchsrezeptorexpression zu reproduzieren. Die quantitative Analyse der Expression im Verhältnis zu der Expression eines Promotor-Konstruktes eines Gens, welches in allen olfaktorischen Rezeptorneuronen exprimiert wird, spricht für einen Mechanismus, der Gruppen von ZOR-Genen für die Expression determiniert. Das axonale Muster olfaktorischer Rezeptorneurone, die mit dem Promotor eines bestimmten Geruchsrezeptors des Zebraärbblings transgen sind, wird hier zum ersten Mal beschrieben. Die grün fluoreszierenden Axone projizieren überwiegend in eine Region des medialen olfaktorischen Bulbus, während die meisten allgemeinen Glomeruli im lateralen Bulbus liegen, wie durch einen rot fluoreszierenden Farbstoff visualisiert wurde. Dieses Muster legt nahe, dass die transgenen Geruchsrezeptorneurone ein endogenes ZOR-Gen exprimieren, welches aus einer Untergruppe des Repertoires an ZOR-Genen im Genom selektiert worden ist.

Basierend auf diesen Beobachtungen wird ein Zwei-Schritt-Modell für den Mechanismus der Regulation olfaktorischer Rezeptorgene vorgeschlagen, welches in einem ersten Schritt die deterministische Wahl einer Gruppe von Genen beschreibt und in einem zweiten Schritt die stochastische Selektion eines Gens aus dieser Gruppe. Der diesem Modell zugrunde liegende molekulare Mechanismus könnte einen Enhancer enthalten, der eine Gruppe von ZOR-Genen determiniert und hierdurch die Aktivierung ermöglicht. Durch stochastische Interaktion des Enhancers mit einem der basalen Promotoren aus dieser Gruppe wird die exklusive Expression eines einzelnen ZOR-Gens aus dieser Gruppe erreicht. Eine Begrenzung der großen Zahl der OR-Gene auf Gruppen

könnte die Entwicklung und den Erhalt der funktionellen Verbindungen zwischen dem Geruchsepithel und dem olfaktorischen Bulbus vereinfachen. Dies könnte möglicherweise einen prinzipiellen Mechanismus der Regulation der Geruchsrezeptorexpression von Vertebraten darstellen.

The sense of smell enables an organism to extract vital information from the odorous composition of its environment. Each olfactory receptor neuron faces the challenging task of selecting one odorant receptor (OR) gene from the vast array of about 100 and 1,000 OR genes in fish and mammals, respectively. Thus far, the control mechanism of this highly differential gene expression is largely unknown.

The present study set out to assess the regulation of OR gene expression by evaluation of several features of OR genes in the olfactory system of a microsmatic vertebrate, the zebrafish, *Danio rerio*. The endogenous expression of eleven zebrafish OR (ZOR) genes was analyzed during embryonic and larval stages of development by *in situ* hybridization. The expression was found to begin in a stereotyped temporal sequence of four groups of ZOR genes within the first three days post fertilization. Quantitative analysis of embryonic expression dynamics revealed that the expression of genes within these groups is significantly more coupled than between groups, which suggests that different groups are controlled by independent regulatory machineries. The frequency of expression increases very slowly during embryogenesis, suggesting that ZOR genes are selected for expression by a stochastic mechanism. The time course of expression during larval development was found to differ for the individual genes, which presumably reflects additional regulatory influences. The genomic arrangement of ZOR genes was examined by a linkage analysis and screen of a zebrafish genomic DNA library. The results indicate that ten of the eleven genes are linked in a large cluster.

Furthermore, ZOR genes of the same onset group were found to adjoin each other. Thus, the genomic arrangement might enable a common transcriptional machinery to control a particular onset group of genes from the large array of OR genes in the genome. The functionality of two putative ZOR gene promoter regions was investigated by means of their ability to drive expression of green fluorescent protein by employing microinjection of reporter gene constructs in 1-2 cell stage zebrafish embryos. Examination of transgene expression in living zebrafish embryos and larvae showed that several features of OR-like expression were mimicked by *cis*-regulatory elements residing in less than 0.3 kb and 1.3 kb of the respective putative ZOR gene promoter. Quantitative analysis of expression relative to the expression of a promoter construct of a gene that is expressed in all olfactory receptor neurons supports a mechanism that determines groups of ZOR genes for expression. The axonal pattern of olfactory receptor neurons that are transgenic for a particular zebrafish OR gene promoter is reported for the first time. The green fluorescent axons project predominantly into a region of the medial olfactory bulb, whereas the majority of general glomeruli, visualized by a red fluorescent dye, is found in the lateral region. This pattern suggests that these neurons express an endogenous ZOR gene, which is selected from a subset of the repertoire of ZOR genes in the genome.

Based on these observations a two-step model for a mechanism of OR gene regulation is suggested, which comprises as a first step the deterministic choice of a group of genes and as a second step the stochastic selection of one gene from this group. The underlying molecular mechanism might comprise an enhancer element that determines a group of ZOR genes to be accessible for activation. By stochastic interaction of this enhancer with any particular basal promoter out of this group, the exclusive expression of a single ZOR gene of the group would be achieved. Restriction of the large array of ORs to groups of genes might facilitate the setup and maintenance of the functional connections between the olfactory epithelium and the olfactory bulb, and thus may constitute a general mechanism of vertebrate OR gene regulation.