



Max Planck Institute for Molecular Genetics



TAKING A FUNCTIONAL GENOMIC APPROACH TO
THE STUDY OF DOWN SYNDROME
PATHOGENESIS

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt von

Marc Sultan

Geboren in Aubervilliers, Frankreich

Eingereicht im Fachbereich

Biologie, Chemie, Pharmazie

der

Freien Universität Berlin



Dezember 2006

1.Gutachter: Prof. Dr. Hans Lehrach

Max Planck Insitute für molekulare Genetik

Inhnestr. 73, D-14195 Berlin

2.Gutachter: Prof. Dr. Constance Scharff

Freie Universität

Takustr. 6, D14195- Berlin

Disputation am Dienstag, den 27 Februar 2007

To Renate, Georges, Audrey and Eva

A New Year's resolution finally fulfilled

In the end, our society will be defined not only by what we create, but by what we refuse to destroy.

-John C. Sawhill, President of The Nature Conservancy, 1990-2000-

1	SUMMARY	1
1	ZUSAMMENFASSUNG	3
2	INTRODUCTION	5
2.1	Incidence.....	5
2.2	History of Down Syndrome	5
2.3	Genetics of Trisomy 21	7
2.4	The DS Critical Region.....	10
2.5	Other Diseases Associated to HSA21.....	12
2.6	Clinical Characteristics of Down Syndrome	15
2.6.1	Morphology	16
2.6.2	Physiopathology of the Brain in DS	16
2.6.3	Mental Retardation	17
2.6.4	Premature Aging.....	18
2.6.5	DS and Alzheimer.....	18
2.6.6	Cardiovascular Defects.....	19
2.6.7	Gastrointestinal Aspects	19
2.6.8	Endocrine Aspects.....	19
2.6.9	Cancer in DS	20
2.6.10	Life Expectancy	21
2.6.11	Fertility	21
2.7	Prenatal Screening and Diagnosis.....	21
2.8	Molecular Analysis of Trisomy 21.....	23
2.9	Mouse Models of Trisomy	27
2.10	The Nematode <i>Caenorhabditis Elegans</i>	34
2.11	Aims of this Study	35
3	MATERIAL AND METHODS	37
3.1	RNA Preparation from Animal Tissues.....	37
3.2	FISH Analysis.....	38
3.3	Hybridization on cDNA Arrays.....	38
3.3.1	Clone Selection and Spotting	38
3.3.2	Probe Preparation.....	39
3.3.3	Radioactivity Incorporation	40
3.3.4	Alkaline Gel for cDNA Quality Assessment	40
3.3.5	Labeling of λ HindIII Marker	41
3.3.6	Hybridization	41

3.3.7	Washing and Scanning Filters	41
3.4	Array Data Analysis.....	42
3.4.1	Image Analysis	42
3.4.2	Data Normalization	42
3.4.3	Judging Gene Expression.....	43
3.4.4	Judging Differential Expression in Ts65Dn and Control Samples.....	43
3.4.5	Clustering of Expression Profiles accross Tissues	44
3.5	Quantitative Real Time PCR	45
3.5.1	Design of Primers for SybrGreen Assays	45
3.5.2	Selection of TaqMan Assays	46
3.5.3	Sample Preparation	46
3.5.4	Quantitative RT-PCR Using SybrGreen.....	47
3.5.5	Validation Experiment.....	47
3.5.6	Quantitative RT-PCR Using TaqMan Probes	48
3.5.7	Analysis of Quantitative Real Time PCR	49
3.6	DNA Preparation	50
3.6.1	Cosmid DNA Isolation.....	50
3.6.2	YAC DNA Isolation	51
3.6.3	Genomic DNA Isolation	51
3.6.4	Plasmid DNA Isolation	51
3.6.5	DNA Quantification and Quality Control.....	52
3.6.6	DNA Analysis by Restriction Enzymes Digestion.....	52
3.6.7	DNA Sequencing	53
3.7	PCR and Cleanup	53
3.7.1	PCR Protocols	53
3.7.2	PCR Programs.....	54
3.7.3	PCR Product Cleanup	54
3.8	<i>C. elegans</i> Nomenclature.....	55
3.9	Nematode Strains	55
3.10	Culture Conditions.....	56
3.11	Freezing Worms.....	57
3.12	Cloning.....	57
3.13	Preparation of Chemically Competent Cells.....	58
3.14	Preparation of <i>C. elegans</i> Total RNA.....	58
3.15	Glycerol Stocks	59

3.16	Microinjections	59
3.17	Microscopy	61
3.18	RNAi.....	61
4	RESULTS.....	63
4.1	Gene Dosage Effects in Nine Tissues of a Mouse Model of Down Syndrome.....	63
4.1.1	Expression Profiles of Mmu21 Genes in Nine Tissues from Control Mice	66
4.1.2	Molecular Signatures of the Mmu21 Genes in Control and Trisomic Mice Show Tissue Specificity	67
4.1.3	Global Overexpression of the Mmu21 Genes Located in the Trisomic Region of Ts65Dn.....	71
4.1.4	Higher Order Transcript Regulation in Trisomy	74
4.2	Gene Expression Variation in Individual Ts65Dn mice by qPCR	76
4.2.1	Expression of Mmu21 Genes in the Brain of individual Mice	77
4.2.2	Gene Dosage Effects in Ts65Dn	77
4.2.3	Variation of Gene Expression in the Brains of Ts65Dn and Controls	83
4.2.4	Prioritization of Candidate Genes for the Trisomy Phenotypes	85
4.3	Functional Analysis of Chr21 Orthologs in <i>Caenorhabditis elegans</i>	89
4.3.1	Selection of Candidate Genes	91
4.3.2	Gene Expression Localization by GFP fusion.....	93
4.3.3	Gene Silencing by RNAi	106
5	DISCUSSION	111
5.1	What is the Molecular Basis of DS Phenotypes?	111
5.2	Dosage Sensitive Genes.....	115
5.3	Consequences of Gene Expression Variation.....	120
5.4	Toward Identifying Candidate Genes for DS Phenotypes	122
5.5	Functional Analysis of Candidate Genes	125
5.6	Perspectives	127
6	REFERENCES	129
7	APPENDIX	141
	CURRICULUM VITAE	163
	ERKLÄRUNG	169
	ACKNOWLEDGEMENTS	170

1 SUMMARY

Down syndrome (DS) or trisomy 21 is a complex congenital disorder affecting 1:700 live births, and a leading genetic cause of mental retardation. The identification of genes and molecular mechanisms responsible for the DS phenotypes has therefore been a high priority for genome research. Using Ts65Dn, a well-established mouse model of DS, we carried out gene expression profiling by cDNA arrays and quantitative Real Time PCR (qPCR). We focused on the chromosome 21 genes orthologs (mmu21) because they are primary contributors of trisomy. We analyzed RNAs from several tissues of Ts65Dn and controls, either as pools or as individual samples. With pools, we observed a trend of 1.5 fold overexpression for the majority of trisomic genes with however exceptions to this rule for a few genes (Kahlem, Sultan *et al.*, 2004). For many genes, it is unlikely that such a modest change in gene expression levels will have drastic effects on the fitness of the organism. To select genes, where slight changes in gene activity could have a more dramatic phenotypic effect, we focused on the normal variation of gene expression levels. Genes whose level of gene expression is critical are more likely to be tightly controlled than those for which slight variation of expression will not have a detrimental effect. Our working hypothesis is that genes relevant for DS reach an expression threshold in trisomic individuals that is not or rarely encountered in controls. Hence, we determined inter-individual expression differences for 50 chr21 gene orthologs in the cortex, midbrain and cerebellum of individual Ts65Dn mice and controls by qPCR (TaqMan). Our study enabled the identification of a short list of potential key contributor genes of the trisomy phenotypes in the brain. Among those, we found App, the amyloid precursor protein (sultan *et al.*, submitted). Although the systematic analysis of mmu21 gene expression profiles contributes to an understanding of how cells and organisms respond to structural gene dosage imbalance, it does not give direct information on gene function. Systematic functional genomic approaches are being carried out in parallel in the laboratory. As part of this, we attempted to contribute a functional analysis study in *Caenorhabditis elegans* for nine selected genes. We monitored tissue specific expression GFP fusions under the control of the respective endogenous promoters. The selected genes were knocked-down by means of RNA

interference (RNAi). The use of *C. elegans* provides an excellent experimental model for the initial characterization of gene function and may become an important tool in assessing the contribution of genes in complex phenotypes such as DS.

1 ZUSAMMENFASSUNG

Down-Syndrom (DS) oder Trisomie 21 ist eine komplexe angeborene Krankheit, die eine aus 700 Lebendgeburten betrifft und welche die weitverbreitetste genetische Ursache geistiger Behinderung darstellt. Daher ist die Erkennung der für die DS-Phänotypen verantwortlichen Gene und molekularen Mechanismen von höchster Priorität für die Humangenomforschung. Unter Verwendung von Ts65Dn, einem etablierten Mausmodell für DS, wurden Genexpressionsprofile mittels cDNA-Chips und quantitativer Real Time-PCR (qPCR) erstellt. Unser Hauptaugenmerk richtete sich dabei auf die Orthologen der Chromosom-21-Gene (*mmu21*), welche als die primären Auslöser des Down-Syndroms gelten. Aus mehreren Ts65Dn-Geweben und Kontrollmäusen wurde jeweils RNA in Pools und Individualproben isoliert. Bei den Pools beobachteten wir für die Mehrzahl der Gene eine Tendenz zu 1,5-facher Überexpression unter Ausnahme einiger weniger Gene (Kahlem, Sultan *et al.*, 2004). Für viele Gene jedoch erscheint es unwahrscheinlich, dass bei einer solch geringfügigen Veränderung des Genexpressionsniveaus drastische Auswirkungen auf die Gesundheit des Organismus entstehen. Bei der Auswahl von Genen, die durch geringfügige Veränderungen des Expressionsniveaus einen Phänotyp verursachen könnten, konzentrierten wir uns auf die Analyse der natürlichen Expressionsvarianz. Gene mit kritischem Expressionsniveau unterliegen tendenziell erhöhter Kontrolle als solche, bei denen eine minimale Expressionsveränderung keine nachteilige Auswirkung zur Folge hätte. Unsere Arbeitshypothese ist, dass die für die DS-Forschung relevanten Gene in Trisomie-Fällen eine Expressionsschwelle überschreiten, die nicht oder nur selten in Kontrollfällen erreicht wird. So stellten wir interindividuelle Expressionsunterschiede bei 50 chr.21-Orthologen im Kortex, Mittelhirn und Cerebellum der individuellen Ts65Dn-Mäuse und Kontrollmäuse durch qPCR (TaqMan) fest. Anhand unserer Untersuchung konnten wir eine Liste potentieller Auslösergene der Trisomie-Phänotypen im Gehirn erstellen. Unter ihnen befand sich zum Beispiel das Amyloid Precursor Protein (*APP*) (Sultan *et al.*, eingereicht). Obwohl die systematische Analyse von *mmu21*-Genexpressionsprofilen dazu beiträgt zu erkennen, wie Zellen und Organismen auf eine strukturelle Störung der genetischen Dosis reagieren, erlaubt sie keine direkte Schlussfolgerungen auf Genfunktionen. Daher wurden parallel

systematische funktionelle Versuche durchgeführt. Hierzu wählten wir neun Kandidatengene aus, um zu versuchen deren Orthologe im Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* zu analysieren. Wir untersuchten die gewebespezifische Expression von GFP-Reportern unter Kontrolle der entsprechenden endogenen Promotoren. Weiterhin wurden die ausgewählten Gene mittels RNA-Interferenz (RNAi) reprimiert. *C. elegans* stellt ein ausgezeichnetes Modell zur Initialcharakterisierung von Genfunktionen dar und scheint dazu geeignet, ein wichtiges Hilfsmittel zur Bewertung des Beitrages einzelner Gene zu komplexen Phänotypen wie DS zu werden.