



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Caracterización de las alteraciones estructurales y funcionales de la corteza cerebral de ratones mutantes de pérdida y ganancia de función de DYRK1A


Juan Arranz Villacañas



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



**CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES
ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA
CORTEZA CEREBRAL DE RATONES
MUTANTES DE PÉRDIDA Y GANANCIA DE
FUNCIÓN DE DYRK1A**

**JUAN ARRANZ VILLACAÑAS
BARCELONA, 2016**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

2016

**CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES ESTRUCTURALES Y
FUNCIONALES DE LA CORTEZA CEREBRAL DE RATONES MUTANTES DE
PÉRDIDA Y GANANCIA DE FUNCIÓN DE DYRK1A**

Tesis realizada en el Instituto Biología Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC)

Memoria presentada por Juan Arranz Villacañas

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

DIRECTORA

TUTOR

M^a Lourdes Arbonés de Rafael

Fernando Aguado Tomás

DOCTORANDO

Juan Arranz Villacañas

AGRADECIMIENTOS

Parece que fue ayer cuando llegué a Barcelona y ya han pasado 5 años. Son muchas las personas a las que tengo que agradecer que este sueño se haya cumplido. La primera persona de todas ellas es la Dra. Mariona Arbonés. Tú fuiste la que hizo posible todo esto y te estaré siempre agradecido por haberme permitido formar parte de esta pequeña familia. He aprendido mil cosas de ti, pero sobre todo, me has enseñado a no dar nada por sentado y a estar seguro en todo momento de lo que hago. Mil gracias por estar siempre ahí, Mariona.

Tengo que agradecer también al Dr. Fernando Aguado por haber aceptado la tutoría de este trabajo y por su disponibilidad y amabilidad.

No tengo palabras para expresar lo que siento por las componentes de mi labo, mi otra familia: Mariajo, Sònia, Isa y Baldu. Espero encontrarme con más personas como vosotras. Este trabajo tiene un poco de todas y cada una de vosotras, muchas gracias por vuestros consejos, apoyo y comprensión, pero sobre todo por hacer que todo sea tan fácil. Ha sido increíble trabajar con vosotras. Por su puesto tengo que agradecer a Silvia y a Mari por el apoyo técnico y personal.

También tengo que dar las gracias a la Dra. Elena Rebollo por las horas que ha invertido en este trabajo, por sus consejos y su paciencia. Y al Dr. Ignasi Sahún por el soporte y asesoramiento en la realización de las pruebas conductuales.

Me gustaría agradecer a todos los componentes de los laboratorios de Elisa Martí, Sebastián Pons y Marian Martínez por los consejos y apoyos recibidos. Y a los swing kids (Sònia, Raquel y Raúl) por todos esos momentos inolvidables dentro y fuera del laboratorio.

Esta tesis también tiene un poco de mis compañeros del laboratorio de neurobiología de la Universidad de Málaga con los que di mis primeros pasos en este mundo científico y de los que aprendí tanto.

Querría dar las gracias a todos los amigos que han tenido que aguantar la chapa de la dichosa tesis y que siempre han estado ahí para escucharme y darme ánimos. Ya os daré las gracias personalmente porque sois una "hartá".

Por último, como no podía ser menos, he de agradecer inmensamente a mi familia: mis hermanos, mis padres y David por vuestro cariño y apoyo incondicional (y económico!!!). Gracias por hacer de mí una persona mejor. Sois los responsables de todo esto. Os quiero.

Gracias de todo corazón a todas y cada una de las personas que han contribuido en este trabajo que también es vuestro.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos del Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2010-17004)

Durante el periodo de realización de esta tesis, disfruté de una beca para la formación del personal investigador (FPI; BES-2011-047472) del Ministerio de Economía y Competitividad.

ABREVIATURAS

ApoB: Apolipoproteína B

App: Proteína precursora del amiloide

BAC: Cromosoma artificial de bacteria

CA1: *Cornu Ammonis 1*

CA3: *Cornu Ammonis 3*

CE: Coeficiente de error

CR: Calretinina

CSS: Corteza somatosensorial

DH: *DYRK homology-box*

DI: Discapacidad intelectual

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DYRK1A: *Dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A*

E: Día embrionario

EEM: Error estándar de la media

EGCG: Epicatequina galato

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

FGF: Factor de crecimiento de los fibroblastos

GABA: Ácido amino-butírico

GD: Giro dentado

His: Dominio aminoacídico de polihistidina

HSA: Cromosoma humano (*Homo sapiens*)

kb: Kilobase

kDa: Kilodalton

LTD: Depresión a largo plazo

LTP: Potenciación a largo plazo

mRNA: RNA mensajero

mM: Milimolar

MMU: Cromosoma de ratón (*Mus musculus*)

NLS: Señal de localización nuclear

nm: Nanómetro

NPY: Neuropeptido Y

N-WASP: *neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*

P: Día postnatal

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEST: Dominio aminoacídico rico en residuos de prolina, ácido glutámico, serina y treonina

PFA: Paraformaldehído

PV: Parvalbúmina

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

RCSD: región crítica del síndrome de down

Rd: Mutación recesiva del gen Pdeb

RNA: Ácido ribonucleico

s: segundos

SB: Solución de bloqueo

SBF: Suero bovino fetal

SD: Síndrome de Down

Ser: Serina

Shh: *Sonic hedgehog*

shRNA: *Short hairpin RNA*

SI: Solución de incubación

SNC: Sistema nervioso central

S/T: Región enriquecida con residuos de serina y treonina

SST: Somatostatina

TA: Temperatura ambiente

TDE: 2,2'-Thiodiethanol

TEA: Trastorno del espectro autista

Thr: Treonina

TTS: Ratón triple trisómico o ratón *DP(16)1Yey/+;Dp(17)1Yey/+;Dp(10)1Yey/+*

Tyr: Tirosina

VGLUT1: Transportador vesicular de glutamato 1

VGAT: Transportador vesicular de GABA

VIP: Péptido intestinal vasoactivo

YAC: Cromosoma artificial de levadura

μl: Microlitro

μm: Micrómetro

μm²: Micrómetro cuadrado

μs: Microsegundo

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
ABREVIATURAS	V
INTRODUCCIÓN	11
1. La corteza cerebral.....	13
1.1. La neocorteza.....	13
1.2. El hipocampo.....	18
2. La proteína quinasa DYRK1A	23
2.1. Características y regulación de DYRK1A.....	23
2.2. Expresión y función de DYRK1A en el sistema nervioso.....	24
3. Síndromes de discapacidad intelectual asociados a <i>DYRK1A</i>	28
3.1. El síndrome de Down	28
3.1.1. Genética	29
3.1.2. Modelos de ratón.....	30
3.1.3. Alteraciones morfológicas del cerebro	32
3.1.4. Modelos de sobre-expresión de DYRK1A.....	34
3.2. Síndrome de discapacidad intelectual asociada a <i>DYRK1A</i>	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Modelos animales	43
1.1. Descripción general y cría.....	43
1.2. Genotipación	44
2. Histología	48
2.1. Preparación de las muestras.....	48
2.2. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	49
2.2.1. Protocolo general	49
2.2.2. Inmunomarcaje de células.....	51
2.2.3. Inmunomarcaje de proyecciones cortico-talámicas.....	51
2.2.4. Inmunomarcaje de sinapsis.....	52
2.3. Microscopía y análisis de imágenes.....	52
2.3.1. Adquisición de las imágenes de inmunohistoquímica.....	53
2.3.2. Adquisición y análisis de las imágenes de inmunofluorescencia	53
2.4. Recuento de células en la corteza somatosensorial y el hipocampo.....	54
2.5. Recuento de sinapsis en la corteza somatosensorial y el hipocampo	55
3. Pruebas neuroconductuales.....	60
3.1. Prueba de las canicas enterradas.....	60
3.2. Prueba de interacción social o del residente-intruso.....	61

4. Análisis estadístico.....	62
OBJETIVOS.....	63
RESULTADOS.....	67
1. Implicación de DYRK1A en las conexiones cortico-talámicas	69
2. Efecto de la variación de la dosis génica de <i>Dyrk1a</i> en la celularidad de la CSS en estadios postnatales.....	76
2.1. Efecto de la pérdida de función de <i>Dyrk1a</i> en el número de neuronas glutamatérgicas	76
2.2. Efecto de la pérdida y ganancia de función de <i>Dyrk1a</i> en el número de neuronas GABAérgicas.....	80
3. Efecto de la variación de la dosis génica de <i>Dyrk1a</i> en la proporción de neuronas excitadoras e inhibitoras.....	83
4. Efecto de la pérdida de función de <i>Dyrk1a</i> en el número de subtipos de neuronas GABAérgicas en la corteza adulta	87
4.1. Corteza somatosensorial.....	87
4.2. Hipocampo	88
5. Efecto de la pérdida de función de <i>Dyrk1a</i> en el número de sinapsis de la corteza cerebral adulta.....	95
5.1. Número de sinapsis en la corteza somatosensorial.....	95
5.2. Número de sinapsis en el hipocampo	97
6. Expresión de c-Fos en el hipocampo de ratones <i>Dyrk1a</i> ^{+/-}	99
7. Estudios conductuales en el ratón <i>Dyrk1a</i> ^{+/-}	101
7.1. Prueba de las canicas enterradas.....	101
7.2. Prueba de interacción social	105
DISCUSIÓN	109
1. Implicación de DYRK1A en la formación de la subplaca	111
2. Efectos de la sobreexpresión de DYRK1A en la composición neuronal de la corteza cerebral	115
3. Alteraciones de la citoarquitectura y función cerebral en el modelo de discapacidad intelectual asociada a mutaciones en el gen <i>DYRK1A</i>	121
3.1. Alteraciones morfológicas	121
3.2. Alteraciones funcionales	126
CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFÍA	135
ANEXO.....	169

INTRODUCCIÓN

1. La corteza cerebral

En este apartado se resumirán las estructuras y los tipos celulares que componen la corteza cerebral, la región del cerebro en la que se centra esta tesis doctoral.

La corteza cerebral es una estructura laminada que se origina en el telencéfalo dorsal embrionario. Se puede clasificar en dos tipos principales: la isocorteza o neocorteza, que se compone de seis capas, y la allocorteza, compuesta por tres capas y que se subdivide a su vez en: la archicorteza o hipocampo y la paleocorteza o corteza olfativa (Valverde, 2002).

1.1. La neocorteza

La neocorteza es la región del cerebro más evolucionada en humano y responsable del raciocinio y del procesamiento de la información sensorial y motora. La neocorteza se divide en distintas regiones en función del tipo de información que recibe. Las cuatro áreas primarias en el ratón son: la corteza somatosensorial, que procesa la información sensorial; la corteza auditiva, que procesa información relativa al sonido; la corteza visual, que procesa la información visual; y la corteza motora responsable del control motor fino (Fig. 1A; Lodato y Arlotta, 2015).

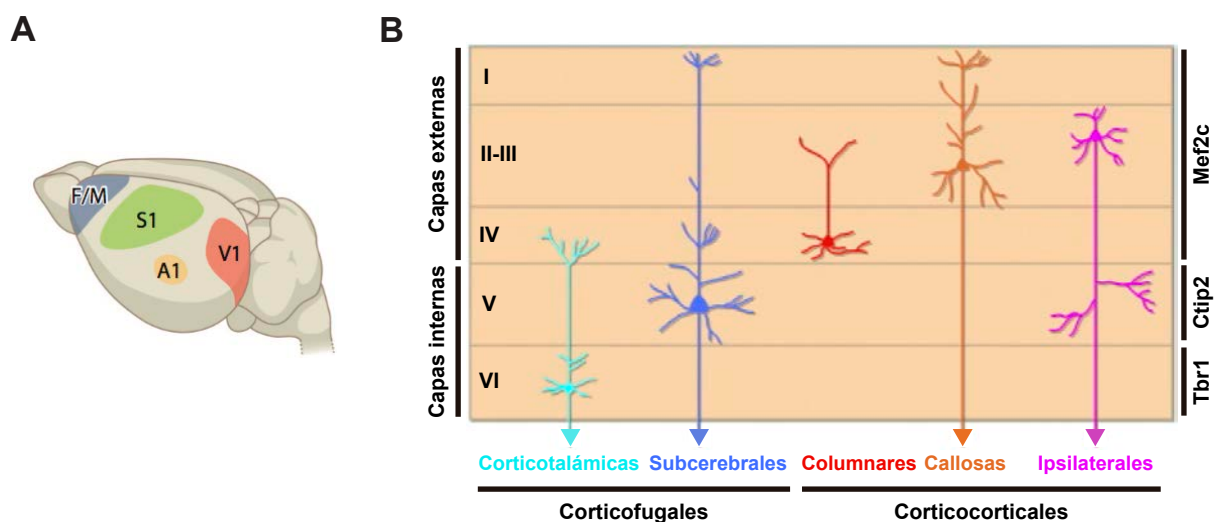


Figura 1. Áreas principales y subtipos de neuronas excitadoras de la neocorteza del ratón. (A) Representación esquemática de las áreas de la neocorteza del cerebro adulto de ratón. (B) Esquema de los subtipos de neuronas excitadoras en el que se detalla la posición, morfología y expresión de factores de transcripción específicos de capa. A1: corteza auditiva; F/M: corteza frontal y motora; S1: corteza somatosensorial; V1: corteza visual. Adaptado de Lodato y Arlotta (2015) (A) y Franco y Muller (2013) (B).

Las seis capas que componen la neocorteza se caracterizan por su diferente densidad neuronal y por los tipos celulares que contienen (Fig. 1B; Jones, 1984). Las capas se numeran del I al VI, siendo la capa I la más externa y la VI la más interna.

Las neuronas neocorticales se clasifican en dos tipos principales: las neuronas glutamatérgicas o excitadoras, que utilizan como neurotransmisor principal el glutamato, y las neuronas GABAérgicas o interneuronas (inhibidoras), cuyo principal neurotransmisor es el ácido gamma-aminobutírico (GABA). Alrededor del 70-80% de las neuronas neocorticales son neuronas excitadoras que extienden sus axones a diferentes dianas intracorticales y subcorticales (Fig. 1B), mientras que el 20-30% restante son interneuronas (Sultan y col., 2013) y realizan conexiones locales en la corteza cerebral (Molyneaux y col., 2007). Ambos tipos neuronales se originan en diferentes regiones del telencéfalo embrionario (Fig. 2) y se pueden agrupar en subclases dependiendo de su morfología, sus propiedades electrofisiológicas y la expresión de ciertos factores de transcripción y otras proteínas.

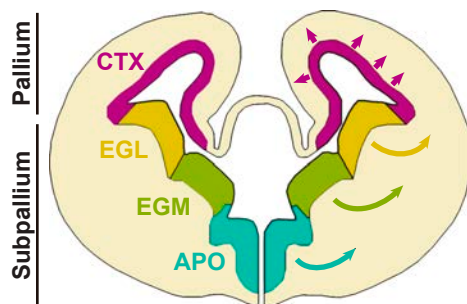


Figura 2. Dominios de generación de las neuronas corticales. En la parte izquierda del esquema se representan los dominios de las zonas ventriculares donde se generan las diferentes neuronas corticales (APO: área pre-óptica; CTX: corteza cerebral; EGL: eminencia ganglionar lateral; EGM: eminencia ganglionar medial). En la parte derecha del esquema se representan los tipos celulares generados en cada dominio y su ruta migratoria (indicados con flechas). Las neuronas excitadoras (flechas magentas) se generan en el *pallium* mientras que las interneuronas (flechas amarillas, verdes y azules) se generan en el *subpallium*. Adaptado de Kriegstein y Álvarez-Buylla (2009)

Las neuronas excitadoras se originan en la pared del ventrículo lateral del *pallium* (zona dorsal telencefálica) durante el desarrollo embrionario; desde el día embrionario (E) 11 hasta E17 en el ratón (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009) En estadios tempranos del desarrollo la pared telencefálica está compuesta por las células neuroepiteliales que forman la denominada zona ventricular. Inicialmente, las células neuroepiteliales proliferan, expandiendo así la zona ventricular (Cai y col., 2002; Noctor y col., 2004). Posteriormente estas células se transforman en otro tipo de progenitor, denominado glía radial, que expresa el factor de transcripción Pax6 y adquiere la capacidad de producir neuronas. La glía radial produce además otro tipo de progenitor, comúnmente denominado progenitor intermedio, que se divide en otra zona proliferativa más alejada del ventrículo denominada zona subventricular (Noctor y col., 2004). En el embrión del ratón la zona subventricular comienza a ser visible a E13 y se expande de manera considerable durante los últimos estadios de la

neurogénesis del *pallium* (Fig. 3A; Dehay y Kennedy, 2007). Los progenitores neuronales de la zona ventricular y la zona subventricular producirán las diferentes neuronas excitadoras que formarán las capas de la neocorteza en un orden temporal altamente regulado. Las primeras neuronas que se generan formarán una capa celular llamada preplaca que posteriormente se dividirá en dos: la zona marginal que constituirá la futura capa I del neocórtex y la subplaca (Fig. 3A). Las células de la subplaca son importantes para que se establezcan correctamente las conexiones neocorticales. Estas células son diana de los axones que llegan al *pallium* procedentes del tálamo (Fig. 3B) y que posteriormente realizarán conexiones con las neuronas excitadoras de la capa IV (Hoerder-Suabedissen y Molnar, 2015). Además, las neuronas de la subplaca son también importantes para guiar a los axones de las neuronas de la neocorteza hacia sus dianas subcorticales (Hoerder-Suabedissen y Molnar, 2015) Los progenitores de la zona ventricular y zona subventricular producen además las neuronas excitadoras de la neocorteza; en primer lugar las de la capa VI y en último lugar las de las capas II-III. Una vez generadas, estas neuronas migran radialmente (Fig. 2) y se sitúan en una capa llamada placa cortical que está entre la zona marginal y la subplaca (Fig. 3A; Greig y col., 2013; Marín-Padilla, 1978; Molyneaux y col., 2007).

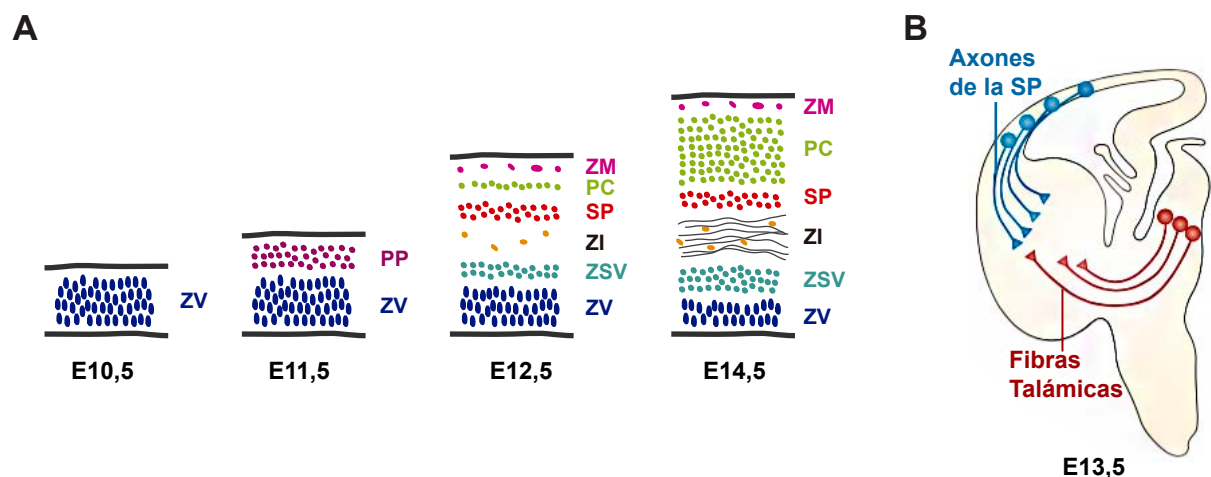


Figura 3. Desarrollo de la neocorteza y de las conexiones cortico-talámicas. (A) Representación esquemática del desarrollo embrionario de la neocorteza del ratón desde E10,5 hasta E14,5. Las neuronas de la subplaca (SP) y de la placa cortical (PC) se generan en la zona ventricular (ZV) y zona subventricular (ZSV). **(B)** Establecimiento de las conexiones cortico-talámicas a E13,5. En azul se muestran los axones de las células de la SP y en rojo los axones de las células talámicas que proyectan a la neocorteza. PP: preplaca; ZI: zona intermedia; ZM: zona marginal. Adaptado de Dehay y Kennedy (2007) **(A)** y Hoerder-Suabedissen y Molnar (2015) **(B)**.

Las neuronas excitadoras de una misma capa presentan una conectividad similar. Las neuronas excitadoras de las capas II-III proyectan a regiones ipsilaterales o contralaterales de la neocorteza; las neuronas de capa IV proyectan localmente en la neocorteza, mientras que las neuronas de las capas más internas (capas V-VI) realizan conexiones corticofugales, que son aquellas que conectan la neocorteza con regiones subcorticales. En concreto, las neuronas de la capa V envían sus axones principalmente a regiones subcerebrales como los ganglios basales, el tronco encefálico o la médula espinal; mientras que las neuronas de la capa VI contactan principalmente con neuronas del tálamo (Fig. 1B; Lodato y Arlotta, 2015; Molyneaux y col., 2007). Además, dentro de una misma capa, las neuronas excitadoras también muestran perfiles similares de expresión génica y se pueden diferenciar de las neuronas de otras capas por la expresión de factores de transcripción concretos. Así por ejemplo, las neuronas de capa VI mantienen una expresión alta de *Tbr1*, las de capa V expresan *Ctip2*, mientras que las de las capas II-IV expresan *Mef2c* (Fig. 1B; Molyneaux y col., 2007).

El otro grupo de neuronas neocorticales, las interneuronas, se generan en la pared del ventrículo lateral del *subpallium* (zona ventral telencefálica), entre E11 y E17 en el ratón, a partir de progenitores de las eminencias ganglionares (medial, lateral y caudal) y el área preóptica (Fig. 2). Estas neuronas migran tangencialmente hacia la parte dorsal del telencéfalo por la zona marginal o por la zona subventricular/zona Intermedia (situada entre la placa cortical y la zona subventricular; Fig. 3.A). Una vez generadas todos los subtipos de neuronas corticales, las interneuronas migran radialmente hasta sus posiciones finales (Sultan y col., 2013).

La población de interneuronas es también muy heterogénea y se han descrito muchos subtipos diferentes en la neocorteza (Gelman y Marin, 2010). El sistema más común para clasificar las neuronas inhibitorias es usando proteínas tipo-específico como proteínas de unión al calcio (Calretinina (CR) y Parvalbúmina (PV)), neuropéptidos (Somatostatina (STT), péptido intestinal vasoactivo (VIP) y neuropéptido Y (NPY)) o glicoproteínas (Relina; Fig. 4). También hay otros sistemas de clasificación basados en las diferencias morfológicas, de expresión y distribución de canales iónicos o en función de sus características electrofisiológicas (Fig. 4; Sultan y col., 2013).

Como se muestra en el esquema de la Fig. 4, las interneuronas mayoritarias en la corteza son las que expresan PV (alrededor del 40%). Este tipo de neuronas no expresan ninguno de los otros marcadores de interneuronas comúnmente utilizados y se distribuyen de manera uniforme en la corteza. Las interneuronas que expresan PV presentan una morfología en forma de cesto o de candelabro e inervan, respectivamente, el soma y las

dendritas proximales o el segmento inicial del axón de las células excitadoras. Además, estas interneuronas muestran un patrón electrofisiológico de descarga rápida de los potenciales de acción (del inglés, *fast-spiking*, FS; Fig. 4). Las células que expresan SST representan alrededor del 30% de las interneuronas corticales y se localizan de forma más abundante en las capas bajas. Las células SST+ forman una subpoblación morfológicamente muy heterogénea, siendo uno de los tipos morfológicos más comunes las células de Martinotti que inervan las dendritas distales de las neuronas excitadoras y muestran patrones de descarga no rápidos (del inglés, *non-fast-spiking*, NFS) o en ráfagas (Fig. 4; DeFelipe y col., 2013; Gonchar y col., 2008; Markram y col., 2004; Sultan y col., 2013; Tremblay y col., 2016). El 30% restante de las interneuronas corticales está compuesto por interneuronas que expresan VIP, CR, relina o NPY. Estos cuatro subtipos de neuronas inervan las dendritas de las neuronas excitadoras. Las interneuronas VIP+ se localizan principalmente en las capas altas de la neocorteza, muestran una morfología bipolar y presentan un patrón de descarga en ráfagas con una frecuencia irregular (del inglés, *irregular-spiking*, IS; Fig. 4). Las células CR+ se localizan principalmente en las capas altas de la neocorteza y presentan una morfología bipolar o double-bouquet y un patrón de descarga de adaptación de rápida (del inglés, *fast adapting spiking*, AD; Fig. 4). Las interneuronas Relina+, al igual que los dos subtipos anteriores, se distribuyen principalmente en las capas altas de la neocorteza, pueden ser células multipolares o células con morfología de neuroglía y presentan un patrón de descarga atrasada (del inglés, *late-spiking*, LS; Fig. 4). Por último, las interneuronas menos abundantes son aquellas que expresan NPY, se distribuyen de manera semejante en las capas altas y bajas de la neocorteza y son células multipolares que muestran un patrón de descarga irregular o de adaptación rápida (AD; Fig. 4; Gonchar y col., 2008; Sultan y col., 2013; Tremblay y col., 2016).

Al igual que en otras regiones del cerebro, la muerte celular programada tiene un papel importante en el desarrollo pues ajusta el número y la proporción de los distintos subtipos de neuronas que forman los circuitos del cerebro adulto (Yamaguchi y Miura, 2015). Se han descrito dos fases de muerte celular programada en la corteza en desarrollo; la primera ocurre durante toda la neurogénesis, siendo cuantitativamente importante alrededor de E14, y afecta principalmente a los progenitores neuronales de la zona ventricular y zona subventricular (Blaschke y col., 1996; Haydar y col., 1999) mientras que la segunda tiene lugar después de la neurogénesis, desde el nacimiento hasta P15 con un pico de muerte alrededor de P7 (Blaschke y col., 1996; Ferrer y col., 1992), y afecta a las neuronas en diferenciación. Se estima que en esta segunda fase mueren fisiológicamente

en la corteza de rata alrededor del 20% de las neuronas excitadoras y del 50% de las interneuronas (Miller, 1995).

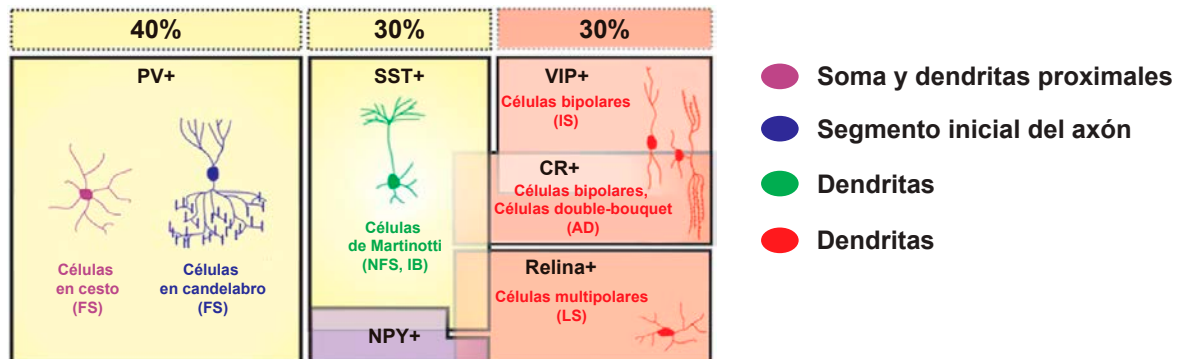


Figura 4. Subtipos de interneuronas en la corteza cerebral del ratón. Diagrama donde se representan los diferentes subtipos de interneuronas clasificados según la expresión de los marcadores parvalbúmina (PV), somatostatina (SST), neuropéptido Y (NPY), péptido intestinal vasoactivo (VIP), calretinina (CR) y relina. El tamaño de los rectángulos es proporcional a la abundancia relativa de los subtipos de interneuronas según esta clasificación. Las propiedades electrofisiológicas se indican debajo del nombre de cada subtipo de interneurona clasificada según morfología: fast-spiking (FS); non-fast-spiking (NFS); intrinsic burst firing (IB); irregular-spiking (IS); fast adapting firing (AD); y late-spiking (LS). Los sitios de contacto de los subtipos de interneuronas con las neuronas excitadoras se indica a la derecha del diagrama. Adaptado de Sultan y col. (2013).

1.2. El hipocampo

El hipocampo o *archicorteza*, forma parte del sistema límbico y es una estructura crucial tanto en procesos de aprendizaje y memoria como en la regulación del comportamiento emocional (Liu y col., 2012; Sugiyama y col., 2013). El hipocampo está formado por el hipocampo propio o asta de Amón (*cornu ammonis*, CA), el giro dentado (GD) o *fascia dentata* y el subículo (Fig. 5). También se considera parte del hipocampo el pre- y para-subículo, que junto con el subículo forman el complejo subicular, y la corteza entorrinal (ver esquema de la Fig. 6) que son áreas perialocorticales, áreas de transición entre la alo corteza y la isocorteza, ambas regiones presentan una laminación en seis capas más o menos diferenciadas (Insausti y col., 1995). Al igual que en la neocorteza, el hipocampo está formado por neuronas excitadoras (90%) y neuronas inhibitoras (10%). Las neuronas excitadoras del hipocampo son: las neuronas piramidales de la CA y las células granulares de soma pequeño del GD. En el hipocampo se encuentran los mismos subtipos de neuronas inhibitoras que en la neocorteza y éstos se distribuyen entre las distintas capas de la CA y GD (Babb y col., 1988).

El asta de Amón o CA está formado por tres regiones; CA1, CA2 y CA3. Las tres presentan una organización en capas, pudiéndose distinguir el *alveus* o sustancia blanca, la capa más alejada del GD compuesta por los axones que proceden de las células piramidales. Interna a esta capa se encuentra el *stratum oriens* (una capa estrecha compuesta principalmente por dendritas de las células piramidales), después la capa piramidal o *stratum pyramidale* (compuesta por los somas de las neuronas piramidales, las neuronas principales del hipocampo), el *stratum radiatum* (compuesto por las dendritas apicales de las neuronas piramidales) y, finalmente, el *stratum lacunosum-moleculare* (la capa más próxima a la fisura hipocámpica que separa el hipocampo propio del GD y contiene las ramificaciones distales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales). En la región CA3 existe una capa extra situada entre la capa piramidal y el *stratum radiatum* que se denomina *stratum lucidum*. Ésta es una capa fina donde los axones de las células granulares (conocidos por fibras musgosas) del GD contactan con las dendritas de las neuronas piramidales (Fig. 5; Amaral y Witter, 1995; Freund y Buzsáki, 1996).

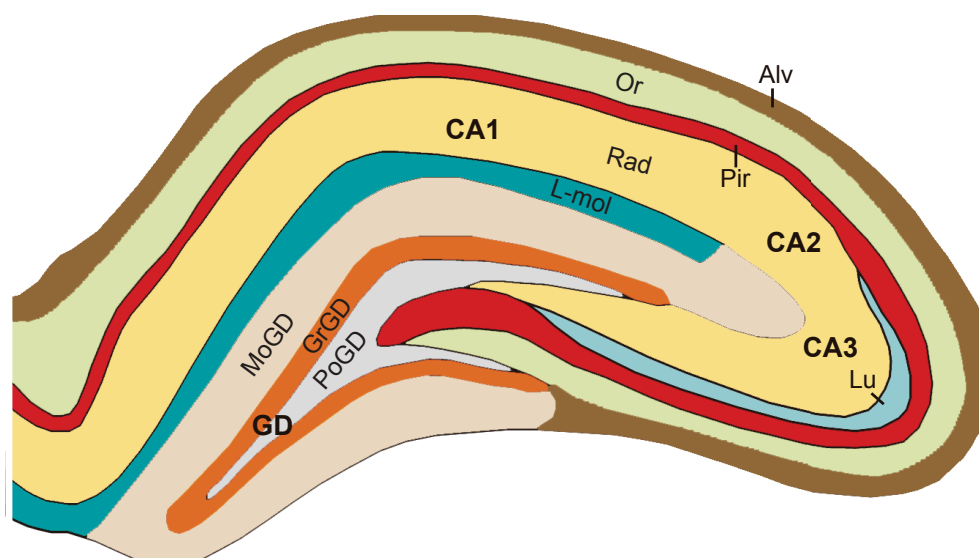


Figura 5. Organización estructural del hipocampo del ratón. Representación esquemática donde se detallan las diferentes capas del hipocampo propio (*cornu ammonis* (CA); CA1, CA2 y CA3) y del giro dentado (GD) de ratones adultos. Alv: *alveus*; GrGD: capa granular del GD; L-mol: *stratum lacunosum-moleculare*; MoGD: *stratum moleculare* del GD; Lu: *stratum lucidum*; Or: *stratum oriens*; Pir: capa piramidal; PoGD: capa polifórmica o *hilus* del GD; Rad: *stratum radiatum*. Adaptado de Amaral y Witter (1995).

La organización del GD es algo más simple y se divide en tres capas: la capa contigua a la fisura hipocámpica, denominada capa molecular o *stratum moleculare*,

compuesta por dendritas apicales de las células granulares; la capa intermedia, denominada *stratum granulare* o capa granular, compuesta por los somas de las neuronas granulares; y la capa polifórmica o *hilus* compuesta por numerosos tipos celulares, aunque las células mejor caracterizadas de esta capa son las células musgosas (Fig. 5; Amaral, 1978; Amaral y Witter, 1995).

Las neuronas excitadoras del hipocampo, las neuronas piramidales y las células granulares, se forman a partir de la zona ventricular del *pallium* en un proceso similar al que ocurre en la neocorteza. En el hipocampo propio las células de la preplaca se originan entre E10 y E14 (Takahashi y col., 1993). A partir de E15 se generan las neuronas piramidales que, tras migrar radialmente, se posicionarán entre la zona marginal y la subplaca, donde formarán la placa hipocámpica. La zona marginal dará lugar al *stratum radiatum* y al *stratum lacunosum-moleculare* (además del *stratum lucidum* en el caso de la región CA3), la placa hipocámpica se convertirá en la capa piramidal y la subplaca dará lugar al *stratum oriens* (Jiang y Swann, 1997; Soriano y col., 1994). Las células granulares del GD se generan a partir E15, aunque el pico máximo de neurogénesis en el GD ocurre durante la primera semana postnatal y la actividad mitótica de esta región se mantiene durante toda la vida del individuo. Tras su generación, las células granulares migran radialmente para formar la capa granular. En el GD la zona marginal dará lugar a la capa molecular y la subplaca dará lugar al *hilus* (Bayer, 1980; Lübbers y col., 1985; Soriano y col., 1994).

Las neuronas excitadoras del hipocampo están conectadas entre sí y con regiones externas del hipocampo mediante diferentes vías. La principal vía aferente del hipocampo conecta con regiones neocorticales y subcorticales mediante la corteza entorrinal. A su vez, las neuronas excitadoras entorrinales conectan con el hipocampo propio y el GD mediante la vía perforante o conexión entorrino-hipocámpica (Fig. 6). Los axones entorrinales atraviesan el subículo para inervar el *stratum moleculare* del GD y el *stratum lacunosum-moleculare* del hipocampo propio (Amaral y Witter, 1995). Además, las células granulares del GD y las piramidales de CA1 y CA3 están conectadas entre sí formando un circuito interno unidireccional que, junto con los axones de la vía perforante, forma el denominado circuito trisináptico. Como se observa en el esquema de la Fig. 6, las células granulares proyectan sus axones (fibras musgosas) hacia las células piramidales de la región CA3 del hipocampo propio. Los axones de estas neuronas piramidales convergen en un haz de fibras denominadas colaterales de Schaffer que conectan con las dendritas de células piramidales que se encuentran en el *stratum radiatum* de la región CA1 (Fig. 6). De aquí el circuito prosigue nuevamente hasta la corteza entorrinal, pudiendo pasar previamente por el subículo (Amaral y Witter, 1995).

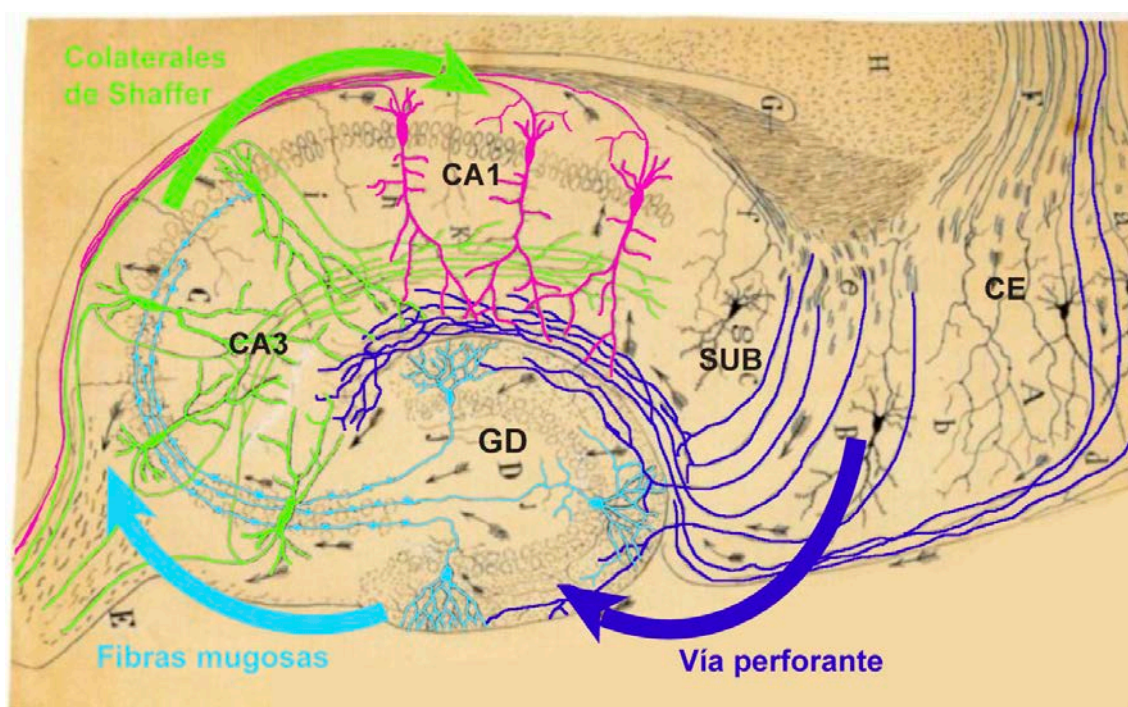


Figura 6. Circuito trisináptico del hipocampo. Esquema en el que se representa las vías que componen el circuito trisináptico del hipocampo. En azul oscuro se marcan los axones procedentes de la corteza entorrinal que componen la vía perforante (flecha azul oscuro) y que contactan con las dendritas de las células granulares del GD (azul claro). Los axones de las células granulares forman las fibras mugosas (flecha azul claro) que, a su vez, contactan con las dendritas de las neuronas piramidales de la CA3 (verde) en el *stratum lucidum*. Los axones de estas neuronas piramidales forman las fibras colaterales de shaffer (flecha verde) que contactan con las dendritas de las neuronas piramidales de la CA1 (rosa) en el *stratum radiatum*. SB: Subículo. CE: Corteza entorrinal. Adaptado de Ramón y Cajal (1901).

Las interneuronas corticales, incluidas las del hipocampo, se generan en la misma ventana temporal y en las mismas regiones del *subpallium* (eminencias ganglionares medial y caudal y área preóptica), que las interneuronas neocorticales (ver apartado 1.1 de esta sección; Fig. 2; Sultan y col., 2013). Los principales subtipos de interneuronas hipocámpicas son aquellas que expresan PV, SST, CR, NPY y VIP (Freund y Buzsáki, 1996). Su conectividad y sus características, tanto morfológicas como electrofisiológicas, se han descrito anteriormente en el apartado 1.1 (ver Fig. 4). Las células que expresan PV se distribuyen mayoritariamente por el *stratum oriens* y la capa piramidal de CA1 y CA2 y por el *hilus* y la capa granular del GD. Las células que expresan SST y NPY se localizan principalmente en el *stratum oriens*, en la capa piramidal de CA1 y CA3, en el *stratum lucidum* y *stratum radiatum* de CA3 y en el *hilus* del GD. Las interneuronas CR+ se distribuyen por todas las capas de CA1 y CA3, y predominantemente en el *hilus* y la capa granular del GD. La población de interneuronas minoritarias son las que expresan el marcador VIP y se distribuyen mayoritariamente en las capas piramidal, *stratum lacunosum-*

moleculare y *stratum radiatum* de CA1 y CA3, y principalmente en la capa granular del GD (Freund y Buzsáki, 1996).

Las neuronas excitadoras son las principales responsables de la funcionalidad cortical, ellas son las que reciben la información aferente y las que responden al estímulo. Por otro lado, las interneuronas son cruciales en el control de la corteza modulando la actividad de las neuronas excitadoras (Isaacson y Scanziani, 2011). Por ello, la integración de un número adecuado de neuronas excitadoras e inhibitoras de la corteza en los circuitos cerebrales es fundamental para su funcionalidad. De hecho, numerosas evidencias indican que un desequilibrio en el balance excitación/inhibición constituye la base neuropatológica de trastornos del neurodesarrollo y enfermedades psiquiátricas como la epilepsia, el autismo, la discapacidad intelectual (DI) o la esquizofrenia (Rubenstein, 2010; Bozzi y col., 2012).

2. La proteína quinasa DYRK1A

2.1. Características y regulación de DYRK1A

La quinasa DYRK1A (Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A) pertenece a la familia de proteínas DYRK (Kentrup y col., 1996). Las quinasas DYRK están presentes en todos los eucariotas y regulan funciones relacionadas con el crecimiento celular y/o el desarrollo (Becker y Joost, 1999). En mamíferos, la familia DYRK cuenta con 5 miembros que se dividen en dos clases: la clase I, que se compone por DYRK1A y DYRK1B; y la clase II, compuesta por DYRK2, DYRK3 y DYRK4 (Aranda y col., 2011). La homología entre los diferentes miembros de la familia DYRK se restringe al dominio quinasa y a una secuencia que precede al dominio quinasa denominado “DYRK homology o (DH) box” (Becker y col., 1998). La secuencia DH está involucrada en la estabilización de la conformación catalíticamente activa de las proteínas DYRK (Soundararajan y col., 2013). Las quinasas DYRK1A y DYRK1B (clase I) son proteínas parálogas y presentan dos homologías adicionales; una señal de localización nuclear (NLS) en la parte amino-terminal de la proteína y un dominio PEST asociado con la estabilidad proteica en la parte carboxi-terminal. DYRK1A difiere de DYRK1B por la presencia de una segunda NLS (NLS₂) dentro del dominio catalítico (Álvarez y col., 2003). Además, DYRK1A presenta en el extremo carboxilo dos dominios que no están presentes en DYRK1B; un dominio de poli-histidina (His) que actúa como señal de direccionamiento al compartimento donde se acumulan los factores de splicing (Álvarez y col., 2003) y una región rica en residuos de serina y treonina (S/T) cuya función no se conoce (Fig. 7; Aranda y col., 2011).



Figura 7. Dominios de la proteína quinasa DYRK1A. Representación esquemática de DYRK1A mostrando los diferentes dominios proteicos desde el extremo amino-terminal (N) hasta el extremo carboxi-terminal (C) y el número de aminoácidos de las dos isoformas conocidas. NLS₁ y NLS₂: Señal de localización nuclear 1 y 2 respectivamente; DH: *DYRK homology box*; QUINASA: Dominio quinasa; PEST: Dominio rico en residuos prolina, glutamato, serina y treonina; His: Dominio de polihistidina; S/T: Dominio rico en residuos serina y treonina. Adaptado de Aranda y col. (2011).

Las proteínas de la familia DYRK tienen especificidad dual porque fosforilan residuos de serina, treonina y tirosina (Aranda y col., 2011; Becker y Joost, 1999; Becker y col., 1998; Kentrup y col., 1996). La fosforilación en tirosina es una autofosforilación y tiene lugar en el segundo residuo tirosina de la secuencia Tyr-X-Tyr (Tyr-319-Tyr-321 en DYRK1A) en el bucle de activación del dominio quinasa (Becker y Joost, 1999). La fosforilación de esta tirosina es fundamental para la actividad quinasa de las proteínas DYRK (Himpel y col., 2000) y ocurre durante la traducción (Lochhead y col., 2005). La capacidad de autofosforilación se pierde una vez que la proteína está completamente traducida. Por ello, a las proteínas DYRK se les considera constitutivamente activas.

DYRK1A tiene un peso molecular aproximado de 90 kDa. El uso de ensamblajes alternativos en el exón 4 da lugar a dos isoformas proteicas de 763 y 754 aminoácidos que difieren en la inclusión/exclusión de 9 aminoácidos en el extremo amino de la proteína. Estas 2 isoformas se expresan en cerebro y otros tejidos pero, hasta la fecha, no se han encontrado diferencias funcionales entre ellas (Aranda y col., 2011).

Dado que DYRK1A es una quinasa constitutivamente activa, se han propuesto distintos mecanismos para regular su actividad catalítica (Aranda y col., 2011; Becker y Sippl, 2011). A nivel transcripcional se han descrito tanto reguladores positivos como negativos. Así por ejemplo, en líneas celulares el factor de transcripción E2F1 es un regulador positivo de *DYRK1A* (Maenz y col., 2008), mientras que el complejo formado por el factor de transcripción AP4 y el co-represor Germinin reprime la transcripción de *DYRK1A* (Kim y col., 2006). Otra posible forma de regular los niveles de DYRK1A es a través de microRNAs (da Costa Martins y col., 2010) o a través de la interacción de DYRK1A con otras proteínas. Ejemplos de este último tipo de regulación son la interacción de DYRK1A con la proteína 14-3-3 β que incrementa la actividad catalítica de la quinasa (Álvarez y col., 2007) o con las proteínas SPRED1 y 2 que la inhiben (Li y col., 2010).

2.2. Expresión y función de DYRK1A en el sistema nervioso

Estudios iniciales realizados mediante Northern blot mostraron expresión de *DYRK1A* en todos los tejidos analizados incluido el cerebro (Kentrup y col., 1996). En esta estructura se observaron transcritos de *Dyrk1a* en prácticamente todas las regiones del cerebro de rata adulta, siendo los niveles de mensajero relativamente abundantes en el bulbo olfativo, la corteza cerebral, la capa de células piramidales del hipocampo y algunos núcleos del hipotálamo (Guimerá y col., 1996). Estudios posteriores de inmunohistoquímica realizados en el ratón adulto mostraron una expresión generalizada de DYRK1A en todo el

neurpilo. Las áreas del cerebro que mostraban mayor inmunoreactividad fueron el bulbo olfativo, la corteza cerebelar y ciertos núcleos motores del mesencéfalo y tronco del encéfalo que sugerían una función de DYRK1A en olfacción y función motora (Marti y col., 2003). Estudios realizados en cultivos primarios de células cerebelares mostraron expresión de DYRK1A no sólo en neuronas sino también en astrocitos (Marti y col., 2003). En muestras humanas se ha detectado expresión de DYRK1A en el núcleo, soma y dendritas de neuronas de la corteza entorrinal y del hipocampo así como en astrocitos y células endoteliales (Wegiel y col., 2004). A pesar de que DYRK1A tiene 2 secuencias NLS y que estudios recientes han demostrado que DYRK1A tiene funciones en el núcleo (Di Vona y col., 2015), los experimentos de fraccionamiento subcelular realizados en cerebro de rata han estimado que tan solo el 5% de la proteína DYRK1A es nuclear (Murakami y col., 2009).

Los estudios de hibridación *in situ* realizados en embriones de ratón y pollo mostraron que *Dyrk1a* se expresa en el tubo neural desde estadios muy tempranos del desarrollo (Fotaki y col., 2002; Hämmerle y col., 2002). Estudios posteriores revelaron una expresión dinámica de DYRK1A tanto en progenitores neurales como en neuronas en diferenciación (Hämmerle y col., 2008). En el árbol dendrítico en crecimiento, la proteína DYRK1A colocaliza con Dinamina 1 (una proteína implicada en endocitosis y sustrato de DYRK1A; Chen-Hwang y col., 2002), hecho que sugería una posible función de la quinasa en la diferenciación de las dendritas (Hämmerle y col., 2003). En todas las regiones del cerebro analizadas, los niveles de la quinasa DYRK1A son elevados al inicio del desarrollo postnatal y decrecen paulatinamente hasta alcanzar niveles significativamente inferiores en el adulto (Hämmerle y col., 2008; Okui y col., 1999).

De acuerdo con los estudios de expresión y los distintos sustratos de DYRK1A identificados hasta el momento, las funciones asignadas a DYRK1A en sistema nervioso son múltiples y abarcan funciones tan diversas como la muerte celular programada o la endocitosis de vesículas sinápticas (revisado en Aranda y col., 2011; Duchon y Herault, 2016; Park y Chung, 2013; Park y col., 2009). A continuación resumiré las actividades/funciones celulares reguladas por DYRK1A en sistema nervioso, haciendo énfasis en aquellas que son relevantes durante el desarrollo.

El primer indicio de que DYRK1A podría tener una función relevante en el desarrollo del cerebro proviene del fenotipo causado por mutaciones en el gen *minibrain* (*Mnb*), el ortólogo de *DYRK1A* en *Drosophila melanogaster*. Como su nombre indica, las moscas *Mnb* presentan una disminución del volumen del cerebro, disminución que es muy evidente en los lóbulos ópticos y hemisferios cerebrales y está causada, al menos en parte, por defectos en

la neurogénesis (Tejedor y col., 1995). Años más tarde se generó el ratón knockout de *Dyrk1a*. Los embriones con una mutación nula, *Dyrk1a*^{-/-}, presentan un retraso severo del desarrollo y mueren al inicio de la neurogénesis. Los ratones con una sola copia funcional de *Dyrk1a* (*Dyrk1a*^{+/-}) son viables, aunque muestran también un retraso significativo del desarrollo y microcefalia. Al igual que en la mosca *Mnb*, la disminución del tamaño del cerebro en los ratones *Dyrk1a*^{+/-} es región-específica, siendo las regiones más severamente afectadas en el ratón el tectum (formado por los colículos inferiores y superiores) y el mesencéfalo ventral (Fotaki y col., 2002). Los mutantes haploinsuficientes *Dyrk1a/Mnb* son hipo-activos y muestran defectos en memoria y aprendizaje (Arqué y col., 2008; Fotaki y col., 2004; Tejedor y col., 1995). La similitud entre los fenotipos de las moscas *Mnb* y los ratones *Dyrk1a*^{+/-} mostraba que las proteínas quinasa DYRK1A/Mnb tienen funciones evolutivamente conservadas. Estudios posteriores realizados en ratones transgénicos de sobre-expresión revelaron que el efecto de DYRK1A en el crecimiento del cerebro es dosis-dependiente (ver apartado 3.2.4).

Los primeros estudios morfológicos de los cerebros de ratones *Dyrk1a*^{+/-} adultos no revelaron alteraciones en la citoarquitectura pero sí en la celularidad de algunas regiones. En este caso, las alteraciones son también región-específicas, presentando algunas regiones, como el tectum y el mesencéfalo ventral una marcada hipocelularidad, mientras que otras presentaban una mayor densidad celular (por ejemplo la neocorteza y ciertos núcleos del tálamo; Barallobre y col., 2014; Benavides-Piccione y col., 2005; Fotaki y col., 2002). Este fenotipo sugería que DYRK1A podría estar regulando la proliferación/diferenciación de los precursores neurales y/o procesos relacionados con muerte celular programada.

Entre los sustratos de DYRK1A que se han ido identificando hasta el momento hay componentes o reguladores de vías de señalización implicadas en el control de la proliferación/diferenciación de los progenitores neurales. Así, por ejemplo, se ha descrito que DYRK1A regula positivamente la vía de señalización del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) fosforilando al inhibidor de la vía Sprouty2 (Aranda y col., 2008). DYRK1A puede actuar también como regulador positivo de la vía de Sonic Hedgehog (Shh) fosforilando al factor de transcripción Gli1 (Mao y col., 2002) o como regulador negativo de la vía de señalización de Notch fosforilando el domino intracelular de Notch (Fernández-Martínez y col., 2009). Además, entre los sustratos de DYRK1A hay 2 reguladores del ciclo de división celular; la Ciclina D1 y P27 (Kip1; Chen y col., 2013; Najas y col., 2015; Soppa y col., 2014). Tal como se explica más adelante, estudios del grupo han mostrado que la fosforilación de la Ciclina D1 por DYRK1A regula la duración de la fase G1 del ciclo celular en la glía radial del *pallium* y, por consiguiente, su potencial neurogénico (Najas y col.,

2015).

Estudios del grupo realizados en la retina y el mesencéfalo ventral de ratones *Dyrk1a*^{+/-} mostraron que DYRK1A regula negativamente la vía intrínseca de muerte celular programada en neuronas en diferenciación a través de un mecanismo que implica la fosforilación por DYRK1A de la Caspasa 9 en un residuo que inhibe su proteólisis y, por consiguiente, su capacidad para activar la vía apoptótica (Barallobre y col., 2014; Laguna y col., 2008; Laguna y col., 2013).

El análisis del árbol dendrítico de las neuronas piramidales de la neocorteza de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} reveló un árbol dendrítico más pequeño y menos ramificado que las neuronas controles. Además, las neuronas *Dyrk1a*^{+/-} tenían dendritas más cortas y con menos densidad de espinas (Benavides-Piccione y col., 2005). En concordancia con este fenotipo, estudios posteriores mostraron que el tratamiento con harmina (un inhibidor de DYRK1A) o con shRNAs específicos de neuronas corticales en cultivo inhibían la neuritogénesis (Göckler y col., 2009; Scales y col., 2009) a través de un mecanismo que implica cambios en la organización del citoesqueleto (Martínez de Lagran y col., 2012). Existen distintas posibilidades a través de las cuales DYRK1A podría regular la morfogénesis de las dendritas, una de ellas es inhibiendo la polimerización de la actina mediada por el complejo Arp2/3 fosforilando N-WASP (neural Wiskott-Aldrich syndrome protein; Park y col., 2012) y otra inhibiendo la polimerización de los microtúbulos fosforilando la de β -tubulina (Ori-McKenney y col., 2016).

Por último, DYRK1A podría estar implicada en la formación y/o función de la sinapsis, fosforilando proteínas implicadas en la endocitosis mediada por clatrin (Adayev y col., 2006; Chen-Hwang y col., 2002; Huang y col., 2004; Murakami y col., 2006), y en la activación de sinapsis glutamatérgicas, fosforilando la subunidad GluN2A de los receptores NMDA del glutamato (Grau y col., 2014).

Las distintas actividades/funciones de DYRK1A descritas sugieren un papel importante de la proteína en el correcto establecimiento de la circuitería cerebral durante el desarrollo, y en su posterior funcionamiento en el adulto.

3. Síndromes de discapacidad intelectual asociados a *DYRK1A*

DYRK1A está relacionado en dos síndromes de DI: el síndrome de Down (SD) y un nuevo síndrome de DI asociada a *DYRK1A* (*Mental retardation, autosomal dominant 7, MRD7*; OMIM # 614104).

3.1. El síndrome de Down

El SD está causado por la triplicación total o parcial del cromosoma 21 humano (*Homo sapiens* 21, HSA21) y constituye la causa genética más frecuente de DI (Epstein, 2002). Esta aneuploidía afecta al 5% de los embarazos reconocidos clínicamente (Hassold y Hunt, 2001) y presenta una incidencia de 1 de cada 700 a 1 de cada 1000 nacimientos (Antonarakis y col., 2004; Karmiloff-Smith y col., 2016). La trisomía completa o simple es la causa más común (alrededor del 95% de los casos) y consiste en la presencia de una copia adicional completa del HSA21 en todas las células del individuo. La trisomía parcial (alrededor del 5% de los casos) se debe a una translocación cromosómicas, generalmente de un fragmento del brazo largo del HSA21 con el HSA14, el HSA22 o el brazo corto del HSA21 (Karmiloff-Smith y col., 2016). El mosaicismo (entre 1-5% de los casos) se debe a una segregación defectuosa de los cromosomas homólogos en las primeras divisiones embrionarias dando lugar a un individuo mosaico, en el que un porcentaje variable de células del individuo es aneuploide y el resto euploide (Papavassiliou y col., 2015).

Los individuos con SD presentan un rango muy amplio de alteraciones fenotípicas con una penetrancia variable, entre las que se incluyen: malformaciones cardíacas (Ferencz y col., 1989), anomalías gastrointestinales (Levy, 1991), anomalías craneofaciales y esqueléticas (Frostad y col., 1971) y alteraciones motoras (Latash y Corcos, 1991). Además, la frecuencia de leucemia infantil en el SD es mayor mientras que la prevalencia de muchos cánceres disminuye en el adulto (Wechsler y col., 2002; Yang y col., 2002). Entre los fenotipos comunes del síndrome se encuentran: la hipotonía muscular, un coeficiente intelectual por debajo de la media y el desarrollo temprano de una demencia tipo Alzheimer (Mann y col., 1985; Sabbagh y col., 2011). Estos dos últimos constituyen uno de los aspectos más invalidantes para las personas con SD (Chapman y Hesketh, 2000).

3.1.1. Genética

El HSA21 es el cromosoma humano más pequeño y su brazo largo (21q) fue secuenciado por Hattori y colaboradores (2000) y contiene alrededor de 250 genes que codifican para proteínas (Antonarakis y col., 2004; Sturgeon y col., 2012) y 29 microRNAs. Estudios de asociación fenotipo-genotipo realizados en los años 90 con individuos que tenían trisomía parcial del HSA21 permitió definir la región del cromosoma asociada a DI. A esta región se le denominó región “crítica” del síndrome de Down (RSCD; Delabar y col., 1993; Korenberg y col., 1994; Rahmani y col., 1990). La comparación de la secuencia de esta región con la de la región sinténica en el cromosoma 16 del ratón (ver Fig. 8) permitió acotar la RSCD a un fragmento de 5,4 Mb. Este fragmento abarca 33 genes codificantes evolutivamente conservados, entre los que se encuentra *DYRK1A* (Toyoda y col., 2002).

Se han formulado distintas hipótesis para explicar los distintos fenotipos causados por la trisomía del HSA21. Una de estas hipótesis es la denominada “efecto por dosis génica” y sostiene que los distintos fenotipos del SD están causados por la sobre-expresión de ciertos genes codificantes del HSA21 que son sensibles dosis (Pritchard y Kola, 1999). Los estudios realizados en ratones trisómicos que modelan el SD (ver más adelante) sugieren que los distintos fenotipos no están causados por genes concretos sino por dominios cromosómicos que son dosis-dependientes (Yu y col., 2010a). Otra hipótesis es la de la “amplificación de la inestabilidad en el desarrollo” postulada por Hall (1965) que propone que el SD es consecuencia del aumento de dosis génica que altera inespecíficamente la homeostasis celular. La relación directa entre el tamaño de la región cromosómica triplicada (número de genes) y la severidad de las alteraciones fenotípicas asociadas apoyaban esta hipótesis (Shapiro, 2001). Sin embargo, el hecho de que algunos individuos con trisomía completa del HSA21 tengan un fenotipo suave la contradice (Korbel y col., 2009). Estas dos hipótesis no son mutuamente excluyentes y se han reformulado en base a resultados de nuevos estudios genéticos (Kuhn y col., 2008; Letourneau y col., 2014; Prandini y col., 2007). Estos estudios sugieren que el SD es el resultado de la sobre-expresión de un grupo de genes codificantes y no codificantes (por ejemplo microRNAs) del HSA21 que cambian la expresión de un número importante de genes en otros. Estos estudios también han puesto de manifiesto la importancia de las modificaciones epigenéticas en los fenotipos asociados al SD (Letourneau y col., 2014; Sailani y col., 2015).

3.1.2. Modelos de ratón

Los modelos de ratón han sido cruciales para el avance científico de diferentes enfermedades y terapias alternativas. En el caso del SD los modelos de ratón han contribuido significativamente a la identificación de genes/regiones cromosómicas del HSA21 asociadas a los distintos fenotipos del SD.

En el ratón, los genes ortólogos al HSA21 se localizan en regiones sinténicas en los cromosomas 10 (*Mus musculus* 10, MMU10), 16 (MMU16) y 17 (MMU17; Fig. 8; Belichenko y col., 2015; Pletcher y col., 2001; Sturgeon y Gardiner, 2011).

El primer modelo de ratón de SD que se generó fue el ratón **Ts16** que tiene en trisomía todo el MMU16 (Fig. 8; Gropp y col., 1975). Este modelo muestra algunas de las alteraciones observadas en pacientes con SD, como defectos inmunológicos y cardíacos, alteraciones craneofaciales y neuromorfológicas como la reducción de la expansión tangencial del neuroepitelio en fetos que da lugar a una reducción del tamaño cerebral (Gearhart y col., 1986; Haydar y col., 1996; Lacey-Casem y Oster-Granite, 1994). Sin embargo, su uso ha sido limitado debido a que los animales Ts16 mueren en los últimos estadios embrionarios o en estadios postnatales tempranos, probablemente debido a las severas malformaciones cardíacas que presentan (Miyabara y col., 1982). Otra limitación de este modelo es que tan sólo 100 genes de los 713 genes que contiene el MM16 son ortólogos al HSA21, el resto están en regiones que presentan sintenia con regiones del HSA3, HSA8, HSA12, HSA16 y HSA22 (Mural y col., 2002).

Otros modelos de SD que presentan trisomía parcial de la región del MMU16 sinténica al HSA21 son el ratón **Ts1Cje** y el ratón **Ts1Rhr** (Fig. 8). El ratón **Ts1Cje** contiene en trisomía alrededor de 70 genes, incluyendo los de la RCSD (Sago y col., 1998), mientras que el ratón **Ts1Rhr** tiene una trisomía menor que abarca tan solo los 33 genes de la RCSD (Olson y col., 2004a). Ambos modelos muestran alteraciones neuromorfológicas características del SD, por ejemplo disminución del volumen del cerebelo y algunas alteraciones cognitivas y conductuales (Belichenko y col., 2009a; Olson y col., 2004a; Sago y col., 1998; Sago y col., 2000). Sin embargo difieren en otros fenotipos que se habían asociado a la RCSD, como las alteraciones de los rasgos faciales, que se observan únicamente en el ratón **Ts1Cje** (Olson y col., 2004b).

Con el objetivo de tener un ratón que modele la trisomía completa se generaron 2 modelos adicionales. El primero de ellos es el ratón **Tc1** generado a partir de células madre embrionarias de ratón que contenían un HSA21 (O'Doherty y col., 2005). Este ratón presenta muchas de las características del SD observadas en otros ratones con una

trisomía menor, por ejemplo defectos motores, en procesos relacionados con la plasticidad sináptica y en memoria y aprendizaje. Sin embargo, el ratón Tc1 muestra otros fenotipos asociados al SD, por ejemplo malformaciones cardíacas, que no se habían observado previamente en ratones con una trisomía menor (Galante y col., 2009; O'Doherty y col., 2005). Este modelo tiene dos limitaciones: el mosaicismos y 2 gaps en el HSA21 (Fig. 8; O'Doherty y col., 2005). El segundo, es el ratón ***DP(10)1Yey/ç;Dp(16)1Yey/+;Dp(17)1Yey/+***. Este modelo fue generado a partir de ratones que tenían en trisomía la región MMU10, MMU16 o MMU17 sinténicas al HSA21 (Li y col., 2007; Yu y col., 2010b). Este modelo, también llamado **TTS** (triple trisómico; Fig. 8), presenta alteraciones en plasticidad sináptica y defectos motores y de aprendizaje semejantes a los observados previamente en otros modelos trisómicos (Belichenko y col., 2015; Yu y col., 2010c).

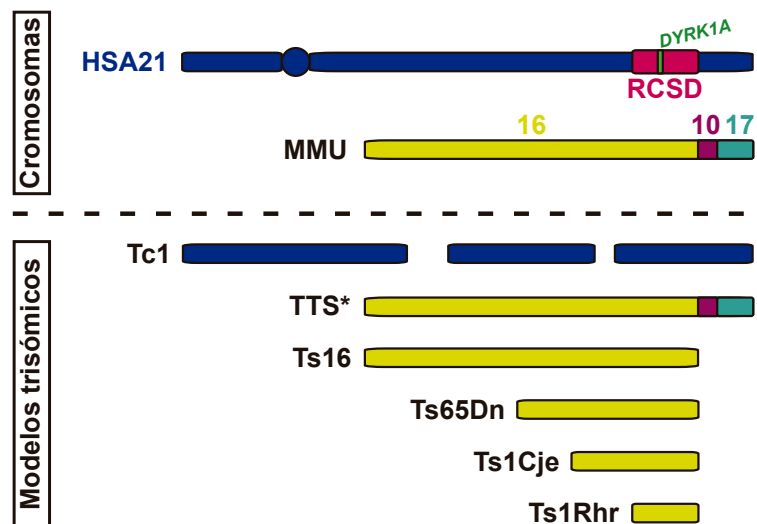


Figura 8. Modelos animales con trisomía de la región crítica del síndrome de Down. Representación esquemática del cromosoma 21 humano (HSA21) alineado con las regiones sinténicas en los cromosomas de ratón (MMU) 16, 10 y 17. El rectángulo magenta situado en el HSA21 muestra la región crítica del síndrome de Down (RCSD) donde se localiza *DYRK1A* (Valverde). En la parte inferior se muestran los principales modelos trisómicos que presentan el gen *DYRK1A* en trisomía. Los diferentes colores indican la procedencia de las regiones cromosómicas de los modelos de ratón: HSA21 (azul oscuro), MMU16 (verde claro), MMU10 (morado) y MMU17 (Valverde). **TTS***: ratón triple trisómico o ratón *DP(16)1Yey/+;Dp(17)1Yey/+;Dp(10)1Yey/+*. Adaptado de Choong y col., (2015).

Por último, el modelo de SD mejor caracterizado hasta la fecha es el ratón **Ts65Dn**. Este ratón tiene un cromosoma adicional, resultado de una traslocación recíproca, formado por la región distal del MMU16 y el centrómero del MMU17. Este cromosoma contiene unos 100 genes ortólogos a los del HSA21, incluyendo los de la RCSD (Davisson y col., 1990; Reinholdt y col., 2011). La disponibilidad del ratón Ts65Dn supuso un gran avance en el

estudio del SD pues permitió estudiar por primera vez los efectos de la trisomía durante el desarrollo postnatal y en el adulto. La caracterización de este modelo reveló fenotipos que se asemejan a los asociados al SD. Así por ejemplo, los ratones Ts65Dn presentan retraso en el desarrollo postnatal, esterilidad masculina, dismorfias craneofaciales, déficits de aprendizaje y memoria y en la función motora, neurodegeneración relacionada con la edad de neuronas colinérgicas que son típicas en la enfermedad de Alzheimer (Holtzman y col., 1996), déficits en la activación de los linfocitos T y malformaciones en el cayado aórtico y el tabique interventricular (Baxter y col., 2000; Costa y col., 1999; Kirsammer y col., 2008; Moore, 2006; Patterson y Costa, 2005; Reeves y col., 1995; Seregaza y col., 2006; Williams y col., 2008).

En el apartado siguiente se describirán algunas de las alteraciones neuromorfológicas asociadas al SD que se han descrito en este modelo murino.

3.1.3. Alteraciones morfológicas del cerebro

Los defectos cognitivos asociados al SD resultan de la combinación de un desarrollo anómalo y de alteraciones en la función cerebral (Haydar y Reeves, 2012). El cerebro de individuos adultos con SD presenta un engrosamiento de los ventrículos cerebrales y una reducción del volumen cerebral debido a la reducción significativa de áreas específicas como la corteza pre-frontal, el hipocampo y el cerebelo (Aylward y col., 1999; Pearlson y col., 1998; Pinter y col., 2001a). Estudios post-mortem realizados en el cerebro de individuos adultos con SD revelaron cambios en el número y la distribución de diferentes poblaciones celulares y anomalías dendríticas en regiones como el hipocampo, el cerebelo y la neocorteza (Haydar y Reeves, 2012). Esta región del cerebro presenta una laminación desorganizada e hipocelularidad. Además, las neuronas excitadoras (piramidales) tienen una menor arborización dendrítica y una disminución tanto de la longitud de las dendritas como del número de espinas dendríticas (Golden y Hyman, 1994; Larsen y col., 2008; Marín-Padilla, 1976; Schmidt-Sidor y col., 1990; Takashima y col., 1989; Wisniewski, 1990). Cambios en la celularidad y laminación de la neocorteza han sido también descritos en fetos y niños con SD (Becker y col., 1986; Golden y Hyman, 1994; Guihard-Costa y col., 2006; Pinter y col., 2001a; Schmidt-Sidor y col., 1990; Stempfle y col., 1999; Takashima y col., 1981; Winter y col., 2000), indicando que las alteraciones corticales en este síndrome empiezan en etapas tempranas del desarrollo.

Algunas de las alteraciones morfológicas observadas en tejido con SD están también presentes en animales Ts65Dn. Estas alteraciones incluyen: braquicefalia, un cerebelo más

pequeño, e hipocelularidad en la neocorteza y el hipocampo (Aldridge y col., 2007; Aylward y col., 1999; Baxter y col., 2000; Insausti y col., 1998; Olson y col., 2004a; Pearlson y col., 1998; Richtsmeier y col., 2002). Además, en estas dos estructuras, las neuronas piramidales de los ratones Ts65Dn muestran un árbol dendrítico menos complejo con dendritas más cortas y con menos espinas que los ratones euploides (Belichenko y col., 2009b; Dierssen y col., 2003).

Los estudios realizados durante el desarrollo embrionario y postnatal de los ratones Ts65Dn han aportado datos sobre la etiología de las alteraciones de la corteza cerebral en el SD (Chakrabarti y col., 2007; Lorenzi y Reeves, 2006). La expansión de la neocorteza en los embriones Ts65Dn está retrasada debido a defectos en el ciclo de división celular de la glía radial del *pallium* y a una menor neurogénesis en la zona ventricular. En consecuencia, los ratones Ts65Dn tienen un déficit de neuronas excitadoras en estadios postnatales (Chakrabarti y col., 2007). Un estudio reciente del laboratorio reveló que esta alteración de la neurogénesis empieza en etapas muy tempranas del desarrollo (alrededor de E11,5) y va asociada a un déficit de Ciclina D1 nuclear en la glía radial y a cambios en el modo de división de estas células (Najas y col., 2015). Dado que la sinaptogénesis ocurre en una ventana de tiempo definida y que ésta parece estar afectada en la neocorteza de los ratones Ts65Dn desde estadios tempranos del desarrollo postnatal (Chakrabarti y col., 2007), los autores de este trabajo sugirieron que el retraso en la generación de neuronas corticales excitadoras podría contribuir al déficit de sinapsis y a las alteraciones de la estructura sináptica observados previamente en la corteza de los ratones Ts65Dn (Belichenko y col., 2004; Kurt y col., 2000).

Al contrario de lo que ocurre en el *pallium*, la generación de neuronas en la zona ventricular del *subpallium* donde se generan las neuronas corticales inhibitoras (ver Fig. 2) es menor en los embriones Ts65Dn que en los controles euploides. En consecuencia, los ratones Ts65Dn presentan un mayor número de ciertos subtipos de neuronas inhibitoras (PV+ y SST+, principalmente) en la neocorteza e hipocampo (Chakrabarti y col., 2010). Estas alteraciones están de acuerdo con el incremento de expresión de proteínas de señalización GABAérgica, como GAD65, GAD67 y el transportador vesicular de GABA tipo 1 (VGAT1), y de proteínas específicas de sinapsis inhibitoras observado en distintas regiones de la corteza cerebral del ratón Ts65Dn (Belichenko y col., 2009b; Pérez-Cremades y col., 2010; Souchet y col., 2014). El tratamiento crónico de ratones Ts65Dn con el antagonista del receptor GABA_A a dosis no epileptogénicas causa la recuperación persistente de las alteraciones cognitivas y de la LTP (Fernández y col., 2007), sugiriendo que la sobreinhibición de los circuitos corticales contribuye a la DI en el SD.

Estudios de rescate genético realizados en embriones Ts65Dn han permitido identificar a *Dyrk1a* como el gen responsable de los defectos en la neurogénesis del *pallium* (Najas y col., 2015) y los genes del HSA21 *Olig1* y *Olig2* como los responsables de los defectos en la neurogénesis del *subpallium* (Chakrabarti y col., 2010). Experimentos de electrofisiología realizados en este último trabajo mostraron que la normalización de la dosis de *Olig1* y *Olig2* rescata la sobre-inhibición de las neuronas piramidales del hipocampo en el modelo Ts65Dn (Chakrabarti y col., 2010). Por otro lado, también se ha descrito que la normalización de la dosis génica de *Dyrk1a* en los ratones Ts65Dn normaliza los defectos de LTP en el hipocampo y mejora la relación de sinapsis excitadoras/inhibidoras y la memoria de referencia y trabajo en el laberinto acuático de Morris (García-Cerro y col., 2014). Los resultados de estos trabajos en su conjunto indican que la trisomía de los genes del HSA21 *OLIG1*, *OLIG2* y *DYRK1A* causan alteraciones en el desarrollo temprano de la corteza cerebral y que estas alteraciones podrían contribuir a la sobre-inhibición asociada al SD.

3.1.4. Modelos de sobre-expresión de DYRK1A

Los modelos de sobre-expresión de genes únicos o grupo de genes se utilizan para estudiar la contribución de genes concretos en los fenotipos asociados a enfermedades cromosómicas. Existen diferentes modelos de ratón que sobre-expresan el gen *DYRK1A* murino o humano: el modelo *TgDyrk1A*, el *BACTgDYRK1A* y el *mBACTgDyrk1a*; o el gen *DYRK1A* humano y otros 4 genes adicionales de la RCSD: el modelo *TgYAC152F7*.

El ratón **TgYAC152F7** tiene integrado en su genoma un cromosoma artificial de levadura (del inglés, *Yeast Artificial Chromosome*; YAC) que contiene un segmento de 5 genes de la RCSD en el HSA21: *PIGP*, *TTC3*, *DSCR9*, *DSCR3* y *DYRK1A* (Smith y col., 1997). Este modelo presenta retraso en el neurodesarrollo, alteraciones motoras y déficits de memoria y aprendizaje (Chabert y col., 2004; Smith y col., 1997). El análisis conductual de otro ratón transgénico, el ratón *TgYAC1527F* tel, que contiene un fragmento del YAC152F7 que abarca únicamente el gen *DYRK1A*, permitió demostrar que los defectos de memoria y aprendizaje de los ratones *TgYAC152F7* son debidos a la sobre-expresión de *DYRK1A* (Smith y col., 1997). El cerebro de los ratones *TgYAC152F7* muestra alteraciones de tamaño y forma (Guedj y col, 2012). Imágenes de resonancia magnética revelaron un incremento generalizado del volumen cerebral de este ratón, siendo el tálamo y el hipotálamo las regiones más afectadas. Este fenotipo parece también ser debido a la sobre-expresión del gen *DYRK1A* puesto que el ratón YAC141g6, contiene un fragmento de la

RCSD que solapa parcialmente con la del YAC152F7 pero excluye al gen *DYRK1A*, tiene un cerebro de tamaño normal (Sebrie y col., 2008). Además, la administración de epicatequina galato (EGCG), un inhibidor de la actividad quinasa DYRK1A (Bain y col., 2003), a hembras gestantes restaura el tamaño cerebral y las alteraciones de memoria a largo plazo en los ratones mutantes TgYAC152F7 (Guedj y col., 2009).

El ratón **TgDyrk1A** expresa una copia completa de cDNA del gen *Dyrk1A* de rata bajo el control de un promotor inducible y heterólogo, el de la metalotioneína-la (psMT-la) bovina, y sobre-expresa niveles moderados de la proteína DYRK1A en el cerebro (Altafaj y col., 2001). Contrariamente a lo observado en el ratón TgYAC152F7, este ratón transgénico no presenta grandes alteraciones en la anatomía cerebral. Sin embargo, análisis neuroconductuales mostraron dificultades severas en la realización de pruebas de memoria y aprendizaje espacial, retraso en la adquisición motora, alteraciones en la organización del comportamiento motor e hiperactividad (Martinez de Lagran y col., 2004). Es interesante señalar que las alteraciones motoras en este modelo pueden ser rescatadas disminuyendo la expresión de DYRK1A en animales adultos mediante inyección estereotáxica en el estriado de un vector viral adeno-asociado (AAV2/1-shDyrk1a) que expresa un shRNA específico para *Dyrk1a* (Ortiz-Abalia y col., 2008). Este experimento abriría la posibilidad de utilizar a DYRK1A como diana terapéutica para mejorar algunos de las alteraciones neurológicas y el deterioro cognitivo asociado a la edad características del SD (Ferron y col., 2010).

Al igual que en el ratón Ts65Dn, las neuronas piramidales de la neocorteza en el modelo TgDyrk1A presentan un árbol dendrítico menos complejo y con menos espinas. Sin embargo, a diferencia de lo observado en el modelo Ts65Dn, el tamaño del árbol dendrítico en los ratones TgDyrk1A no está afectado (Martínez de Lagran y col., 2012). Por último mencionar que el ratón TgDyrk1A presenta alteraciones en la neurogénesis de la zona subgranular del hipocampo adulto (Pons-Espinal y col., 2013) semejantes a las descritas previamente en ratones Ts65Dn (Clark y col., 2006).

Existen dos modelos de ratón con una copia adicional del gen *DYRK1A* integrada en su genoma. Estos modelos fueron generados mediante la utilización de cromosomas artificiales de bacteria (del inglés; *Bacterial artificial chromosome*; BAC) y son el ratón **BACTgDYRK1A**, que contiene una copia del gen *DYRK1A* humano (Ahn y col., 2006), y el ratón **mBACTgDyrk1a**, que contiene una copia adicional del gen *Dyrk1a* de ratón (Guedj y col., 2012). La expresión de la copia "extra" de *DYRK1A* en estos dos modelos está regulada por las secuencias reguladoras del gen, lo cual supone una ventaja respecto al modelo TgDyrk1A para estudiar el SD. Teniendo en cuenta que las proteínas DYRK1A de

ratón y humano difieren en tan solo 3 aminoácidos y que los elementos reguladores en las secuencias del promotor pueden ser diferentes entre especies, el ratón mBACTg*Dyrk1a* representa el mejor modelo para estudiar el efecto de la sobre-expresión de DYRK1A en el contexto del SD. De hecho, el fenotipo de estos dos modelos no es idéntico, a pesar de que los niveles de expresión de DYRK1A en el cerebro son similares (1,5 veces mayor que en los controles). El ratón BACTg*DYRK1A* y el ratón mBACTg*Dyrk1a* muestran alteraciones de memoria y aprendizaje similares a las descritas en el ratón Ts65Dn, pero solo el ratón mBACTg*Dyrk1a* presenta alteraciones motoras (Ahn y col., 2006; Souchet y col., 2014). También se han reportado alteraciones en la LTP en el hipocampo del ratón BACTg*DYRK1A* (Ahn y col., 2006) y en la corteza pre-frontal del ratón mBACTg*Dyrk1a* (Thomazeau y col., 2014). En este último modelo, se observó una mayor densidad de espinas dendríticas en la neuronas piramidales y niveles elevados de PSD95, una proteína de andamiaje que se expresa abundantemente en sinapsis excitadoras (Thomazeau y col., 2014). La cuantificación en extractos proteicos de la neocorteza y el hipocampo de ratones mBACTg*Dyrk1a* adultos mostraron una disminución de los niveles de proteínas glutamatérgicas (subunidades de receptores glutamatérgicos y VGLUT1) y un incremento de los niveles de proteínas GABAérgicas (GAD67 y VGAT1) similares a los observados en el modelo Ts65Dn. Además, los ratones mBACTg*Dyrk1a* presentan una menor sensibilidad a dosis convulsionantes de Pentilenetetrazol, un antagonista de los receptores GABA_A (Souchet y col., 2014). Estos resultados son indicativos de una sobre-inhibición de los circuitos corticales. La cuantificación de los principales subtipos de neuronas inhibitoras en la corteza somatosensorial adulta del ratón mBACTg*Dyrk1a* mostró un incremento de neuronas SST+ y un déficit de neuronas PV+ (Najas, 2014). Este desequilibrio entre neuronas SST+/PV+ podría contribuir a la sobre-inhibición observada en este modelo.

Tanto el ratón BACTg*DYRK1A* como el ratón mBACTg*Dyrk1a* muestran un incremento en el peso y el tamaño del cerebro (Ahn y col., 2006; Guedj y col., 2012). El análisis morfológico del cerebro en el modelo mBACTg*Dyrk1a* reveló algunas similitudes con el modelo Ts65Dn: ambos presentan braquicefalia y aumento del tamaño de los ventrículos cerebrales (Guedj y col., 2012). Tal como se muestra en la Fig. 9, las alteraciones de tamaño y forma del cerebro en el ratón mBACTg*Dyrk1a* son opuestas a las del ratón haploinsuficiente *Dyrk1a*^{+/-}. Además, las regiones cerebrales que presentan un tamaño incrementado en el ratón mBACTg*Dyrk1a* (el tectum, el hipocampo y ciertos núcleos talámicos) son las que están más disminuidas en el ratón *Dyrk1a*^{+/-}. También se han visto fenotipos contrarios entre los dos mutantes *Dyrk1a* en la celularidad de algunas áreas del cerebro, como la neocorteza, que está disminuida en el ratón con 3 copias del gen *Dyrk1a* y aumentada en el ratón con 1 copia del gen (Guedj y col., 2012; Najas, 2014). Los fenotipos

de los ratones mBACTg*Dyrk1a* y *Dyrk1a*^{+/-} pusieron en evidencia el efecto dosis-dependiente de la proteína DYRK1A en el crecimiento y desarrollo del cerebro. Estudios realizados en el laboratorio durante el desarrollo embrionario del ratón mBACTg*Dyrk1a* pusieron de manifiesto que la sobre-expresión de DYRK1A altera el modo de división de la glía radial del *pallium* al inicio de la neurogénesis, promoviendo la generación de progenitores intermedios a expensas de la generación de neuronas. En consecuencia, los ratones mBACTg*Dyrk1a* tienen un déficit de neuronas de capa VI que se mantiene hasta estadios postnatales. Estos ratones muestran también un déficit de neuronas de capas altas (II-III) que es debido a un agotamiento prematuro del pool de progenitores de la zona subventricular (Najas y col., 2015). En el *subpallium* de los embriones mBACTg*Dyrk1a* se han descrito alteraciones en la neurogénesis que podrían explicar los cambios en el número de neuronas SST+ y PV+ observado en la neocorteza de ratones adultos (Najas, 2014).



Figura 9. Alteraciones morfométricas en los cerebro de los mutantes mBACTg*Dyrk1a* y *Dyrk1a*^{+/-}. Secciones coronales del cerebro de ratones adultos mBACTg*Dyrk1a* (3 copias del gen *Dyrk1a*), *Dyrk1a*^{+/-} (1 copia del gen *Dyrk1a*) y sus respectivos controles de camada en las que se observa una alteración desproporcionada del tamaño de los colículos superiores (cs) en ambos mutantes *Dyrk1a*. fv: fasciculus retroflexus; tm: tracto mamilo-talámico. Barra de escala: 2 mm. Adaptado de Najas (2014).

3.2. Síndrome de discapacidad intelectual asociada a *DYRK1A*

Las primeras evidencias sobre la implicación de la haploinsuficiencia de *DYRK1A* en DI provienen de estudios de asociación fenotipo-genotipo realizados en casos con monosomía parcial del HSA21. Estos estudios acotaron una región de 1.2 Mb, alrededor del gen *DYRK1A*, como la responsable de la DI, microcefalia y retraso del desarrollo asociadas a ciertas monosomías de HSA21 (Chettouh y col., 1995; Matsumoto y col., 1997). La similitud entre el fenotipo de estos pacientes y el de las moscas *minibrain* (Tejedor y col., 1995) fue lo que llevó a proponer que el gen haploinsuficiente en esta región del HSA21 es *DYRK1A*. Esta idea se confirmó años más tarde con la identificación de 3 pacientes que presentaban microcefalia primaria y retraso en el desarrollo; dos de ellos con una traslocación balanceada que trunca el gen *DYRK1A* (Møller y col., 2008) y uno con una

microdelección en *DYRK1A* (van Bon y col., 2011). Posteriormente, se identificaron 3 pacientes con TEA y mutaciones *de novo* (2 de desplazamiento del marco de lectura y 1 de splicing) en el gen *DYRK1A* (Lossifov y col., 2012; O'Roak y col., 2012a). Además de una baja respuesta social, estos 3 pacientes presentan microcefalia y retraso en la adquisición del lenguaje (O'Roak y col., 2012b).

Durante el transcurso de esta tesis se han reportado más de 50 pacientes con un diagnóstico de DI y/o trastorno del espectro autista (TEA) con mutaciones puntuales *de novo* en el gen *DYRK1A*. El fenotipo de estos pacientes definió un nuevo síndrome de DI, del inglés “*DYRK1A*-related intellectual disability syndrome” asociado al locus *MRD7* (OMIM # 614104). Este nuevo síndrome se caracteriza por la presencia de DI moderada o severa, ausencia de habla o retraso en la adquisición del lenguaje, retraso del desarrollo, microcefalia y TEA con comportamiento ansioso y/o estereotipado. Además, la mayoría de los pacientes presentan una dismorfia facial típica (fisuras palpebrales, nariz corta con punta ancha y orejas prominentes con los lóbulos subdesarrollados), episodios febriles o epilepsia, problemas de alimentación al nacer que pueden persistir y alteraciones motoras (van Bon y col., 2015a).

Entre las mutaciones puntuales *de novo* descritas en los pacientes con síndrome de DI asociado a *DYRK1A* se encuentran: deleciones, mutaciones sin sentido, mutaciones de cambio de sentido y mutaciones de cambio del marco de lectura (frameshift; ver Tabla 1). La mayoría de las mutaciones puntuales descritas se encuentran en la región que codifica el dominio quinasa de *DYRK1A* o el extremo amino de la proteína (Fig. 10). Seis de las cinco mutaciones con cambio de sentido están en el dominio quinasa. La única mutación con cambio de sentido (p.Thr588Asn; ver Fig. 10) encontrada fuera del dominio quinasa, cambia el primer residuo del dominio de poli-histidina (His; ver capítulo 2.1; Luco y col., 2016). Entre las mutaciones recurrentes en el gen *DYRK1A* se encuentra una mutación sin sentido (p.Arg 205; ver Fig. 10) situada en el extremo N-terminal del dominio quinasa. El fenotipo de los 4 pacientes descritos con esta mutación no difiere significativamente del resto de los pacientes con mutaciones puntuales o cromosómicas (traslocaciones y microdeleciones) en el gen *DYRK1A* identificados hasta el momento (Luco y col., 2016). Por ello, y aunque no se ha demostrado formalmente, se cree que las mutaciones de cambio de sentido identificadas en pacientes son de pérdida de función.

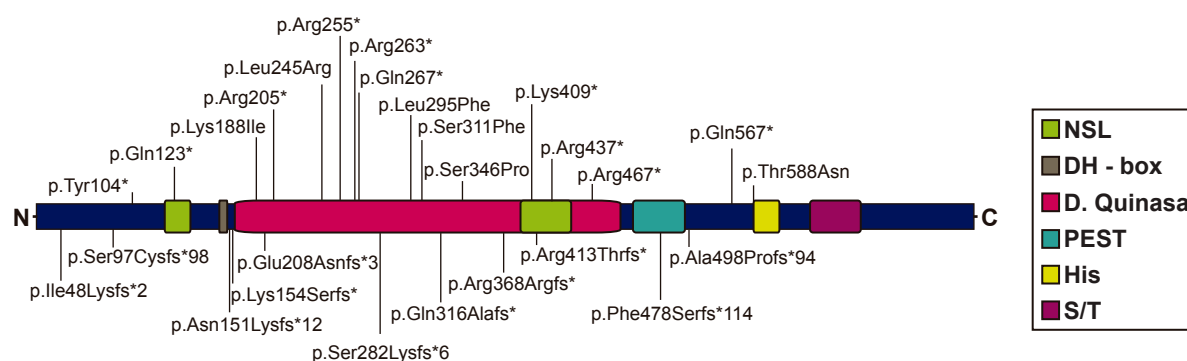


Figura 10. Representación de las mutaciones *de novo* identificadas en pacientes en la proteína DYRK1A. En la parte superior del esquema de la proteína se indican las mutaciones con cambio de sentido (missense) y sin sentido (nonsense) y en la parte inferior las mutaciones de desplazamiento del marco de lectura (frameshift). La mayoría de las mutaciones están en el dominio quinasa (D. quinasa) de la proteína. NLS: Señal de localización nuclear; DH-Box: *DYRK homology box*; PEST: Dominio rico en residuos prolina, glutamato, serina y treonina; His: Dominio de polihistidina; Adaptado de Luco y col. (2016).

Tabla 1. Resumen de las mutaciones puntuales identificadas en DYRK1A

Nº de pacientes	Tipo de mutación	Referencia
1	Delección	(Matsumoto y col., 1997)
1	Delección	(Fujita y col., 2010)
2	2 delecciones	(Oegema y col., 2010)
3	3 delecciones	(Yamamoto y col., 2011)
1	Delección	(van Bon y col., 2011)
1	Delección	(Valette y col., 2012)
2	1 delección, 1 frameshift	(Courcet y col., 2012)
3	2 frameshifts, 1 splicing	(O'Roak y col., 2012a)
1	Sin sentido	(Okamoto y col., 2015)
2	1 sin sentido, 1 frameshift	(Redin y col., 2014)
1	Sin sentido	(Iglesias y col., 2014)
2	1 sin sentido, 1 cambio de sentido	(Ruaud y col., 2015)
5	2 sin sentido y 3 splicing	(van Bon y col., 2015b)
10	3 sin sentido, 2 cambio de sentido, 4 frameshifts, 1 delección	(Bronicki y col., 2015)
14	3 sin sentido, 3 cambio de sentido, 3 frameshifts, 5 delección	(Ji y col., 2015)
2	1 sin sentido, 1 splicing	(Luco y col., 2016)
1	1 frameshift	(Rump y col., 2016)

Tabla modificada de Luco y col. (2016).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelos animales

1.1. Descripción general y cría

En la realización de esta tesis se usó el ratón (*Mus musculus*) como modelo de experimentación. Concretamente se usaron tres modelos de ratón genéticamente modificados. El ratón con un alelo nulo de *Dyrk1a* en heterocigosis (*Dyrk1a*^{+/-}), el ratón con tres copias funcionales del gen *Dyrk1a* (mBACTg*Dyrk1a*) y el ratón Ts(17¹⁶)65Dn (Ts65Dn) que presenta una trisomía parcial del cromosoma 16.

El modelo de ratón de pérdida de función de *Dyrk1a*, *Dyrk1a*^{+/-}, fue generado en el laboratorio mutando el gen en células madre embrionarias de ratón 129 mediante recombinación homóloga y posterior inyección de las células recombinantes a blastocistos de ratón C57BL/6J (Fotaki y col., 2002). El ratón *Dyrk1a*^{+/-} fue mantenido en su acervo genético original mediante cruces repetidos de machos *Dyrk1a*^{+/-} con hembras silvestres F1 C57BL/6Jx129S2/SvHsd (Harlan Laboratories). Los cruces se realizaron usando machos *Dyrk1a*^{+/-} debido a que las hembras *Dyrk1a*^{+/-} suelen abandonar a las crías.

El modelo de ratón de ganancia de función de *Dyrk1a*, el ratón mBACTg*Dyrk1a*, lleva integrado en su genoma un BAC (cromosoma artificial bacteriano) de 152 kb (clon 184N10 de una librería de ratón comercial; Research Genomics) que contiene el gen completo *Dyrk1a* (126 kb) y secuencias reguladoras 5' y 3'. Este ratón fue obtenido mediante la electroporación del clon 184N10 en células madre embrionarias de ratón C57BL/6J y la posterior microinyección de células con el BAC integrado en su genoma (3 copias del gen *Dyrk1a*) en blastocistos de la misma cepa (Guedj y col., 2012). Este modelo de sobre-expresión fue cedido por el Dr. Jean Maurice Delabar (Universidad Paris Diderot, París, Francia) y, se mantuvo en su acervo genético original mediante cruces repetidos de hembras silvestres C57BL/6J (Charles River) y machos mutantes mBACTg*Dyrk1a*.

El ratón Ts65Dn fue generado en los laboratorios Jackson (The Jackson Laboratory) y contiene un cromosoma artificial resultado de una translocación recíproca entre los cromosomas 16 y 17 de ratón. Este cromosoma está compuesto por el centrómero y el extremo proximal del cromosoma 17 (alrededor de 9.5 Mb) y el extremo distal del cromosoma 16 (alrededor de 34 Mb) (Davisson y col., 1990). El ratón Ts65Dn contiene en trisomía aproximadamente dos tercios de los genes ortólogos del HSA21 en el ratón, desde el gen *Mrp139* hasta el telómero (Akeson y col., 2001), incluidos los genes de la RCSD (Davisson y col., 1993).

Este modelo trisómico se mantuvo mediante cruces entre hembras Ts65Dn (The Jackson Laboratory) y machos silvestres B6EiC3 (Harlan Laboratories). Los cruces se realizan con hembras trisómicas debido a que los machos son funcionalmente estériles (<https://www.jax.org/research-and-faculty/tools/cytogenetic-and-down-syndrome-models-resource/protocols>). Los ratones B6EiC3 son portadores de una mutación recesiva, la mutación *Pde6b^{rd1}* o *rd1* (retinal degeneration 1), que en homocigosis genera ceguera (Chang y col., 2002). Para evitar un posible sesgo en los resultados debido a defectos en la visión de algunos animales, se decidió genotipar las hembras, tal como se explica a continuación en el apartado 1.2, y utilizar para los cruces aquellas que no eran portadoras de la mutación *rd1*. Para obtener ratones Ts65Dn disómicos para *Dyrk1a* (Ts65*Dyrk1a^{+/+}*) se realizaron cruces entre hembras Ts65Dn y machos *Dyrk1a^{+/-}*.

Para generar embriones de un determinado día de gestación, se realizaron cruces controlados. Para ello se estabularon en una misma jaula dos o tres hembras con un macho y, a la mañana siguiente, se seleccionaron las posibles hembras gestantes por la presencia del tapón mucoso vaginal postcoital. El día en el que el tapón mucoso fue detectado, se consideró día embrionario 0,5 (E0,5). Los ratones postnatales y adultos (consideramos adultos a los ratones de 2 meses de edad o mayores) fueron generados mediante cruces continuos y el día del nacimiento se consideró día postnatal 0 (P0).

Los animales se estabularon en el animalario del Parc Científic de Barcelona (PCB-PRBB). Las condiciones de estabulación de los animales fueron de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad en condiciones ambientales controladas de humedad (60%) y temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) con acceso a comida y agua *ad libitum*.

A lo largo del trabajo de experimentación, los animales fueron tratados de acuerdo con la normativa de la Directiva de la Comisión Europea (2010/63/UE) y la legislación española (Real decreto 53/2013) para el cuidado y el manejo de animales de investigación. Todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo siguiendo los protocolos aprobados por el Comité de Experimentación Animal del PCB, por la Generalitat de Catalunya y teniendo en cuenta los principios de reemplazamiento, reducción y refinamiento exigidos.

1.2. Genotipación

El genotipado de los embriones y los ratones se hizo mediante PCR (Reacción de la Polimerasa en Cadena) o PCR-semicuantitativa usando ADN genómico obtenido de una

muestra de tejido. Para el genotipado de embriones y ratones postnatales se utilizó un fragmento de cola de unos 0,5 cm de longitud y para el de ratones adultos un fragmento de oreja de aproximadamente 0,3 cm de diámetro. El ADN fue extraído incubando tejido fresco o congelado en NaOH 50 mM a 95°C. El tiempo de incubación y volumen de NaOH se ajustó dependiendo del tipo y tamaño de muestra. Así por ejemplo, las muestras de cola de embrión se incubaron en 200 µl de NaOH durante 20 min, mientras que las muestras de ratones P0-P14 se incubaron en 300 µl de NaOH durante 60 min. Tras la incubación, se añadió 1/10 del volumen inicial de Tris-HCl 100 mM a pH = 8. Posteriormente, las muestras se centrifugaron en una microcentrífuga a máxima velocidad durante 10 min. Tras descartar el pellet, el ADN de la muestra (sobrenadante), se guardó a 4°C hasta su utilización. Las PCRs se realizaron usando 1 µl del sobrenadante.

El genotipado por PCR de las líneas *Dyrk1a*^{+/-}, mBacTg*Dyrk1a* y Ts65Dn se realizó siguiendo protocolos publicados (Fotaki y col., 2002; Guedj y col., 2012; Reinholdt y col., 2011). Los cebadores (Sigma-Aldrich) y las condiciones de las PCRs se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores y condiciones de las PCRs para el genotipado de ratones

Ratón	Cebador	Secuencia del cebador 5'-3'	T/N	pb
<i>Dyrk1a</i> ^{+/-}	Neo T2(S)	AAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATG	61/28	250/160
	Dyrk1a- I4(S)	ACAGTGAGGCTGTTCCCTAGTGAAACTG		
	Dyrk1a- I5(A)	ACGGCTTATGTTCTTCAACAGGTCAGG		
mBACTg <i>Dyrk1a</i>	Bac11-u(S)	CCGGGGATCCTCTAGAGTCG	66/35	200
	Dyrk-r(A)	ACCCAGCTAACCAACATCCAT		
	Dyrk-l(S)	TGGGCCAAGCAGTTAGGAGTTT	66/35	200
	Bac11-r(A)	CCATGATTACGCCAAGCTATTTAGG		
Ts65Dn	Wt-IMR8545(S)	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	55/40	600/275
	Wt-IMR8546(A)	GGAGCGGGAGAAATGGATATG		
	Chr17(S)	GTGGCAAGAGACTCAAATTCAAC		
	Chr16(A)	TGGCTTATTATTATCAGGGCATT		
Rd1	W149(S)	CATCCCACCTGAGCTCACAGAAAG	58/35	298
	W150(A)	GCCTACAACAGAGGAGCTTCTAGC		

T: Temperatura de anillamiento en °C. N: número de ciclos. bp: pares de bases del producto/s de las PCR. S: cebador sentido. A: cebador antisentido. El genotipado del ratón mBACtgDyrk1a se realizó con los cebadores Bac11-u(S) y Dyrk-r(A) o con los cebadores Dyrk-l(S) y Bac11-r(A).

Además, el genotipado de los ratones Ts65Dn se realizó también mediante PCR semicuantitativa, siguiendo el protocolo descrito por Liu y colaboradores (2003) que consiste en amplificar simultáneamente dos genes (*APP* y *Mx1*) localizados en el segmento del cromosoma 16 que está en trisomía y un gen control, el gen *ApoB*, situado en otro cromosoma y cuantificar los niveles relativos de DNA amplificado utilizando sondas Taqman (Applied Biosystems). Las secuencias de cebadores (Sigma-Aldrich) y sondas así como el tamaño de los amplicones se detallan en la Tabla 3. Estas PCRs se realizaron en el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System de Applied Biosystems.

Tabla 3. Secuencia de los cebadores y sondas Taqman para el genotipado por PCR semi-cuantitativa de los ratones Ts65Dn

Cebador / sonda	Secuencia 5'-3'	pb
ApoB(S)	CACGTGGGCTCCAGCATT	74
ApoB(A)	TCACCAGTCATTTCTGCCTTTG	
App(S)	TGCTGAAGATGTGGGTTCTGA	79
App(A)	GACAATCACGGTTGCTATGACAA	
Mx1(S)	TCTCCGATTAACCAGGCTAGCTAT	75
Mx1(A)	GACATAAGGTTAGCAGCTAAAGGATCA	
ApoB-vic [*]	CCAATGGTCGGGCACTGCTCAA	
App-FAM [*]	CAAAGGCGCCATCATCGGACTCA	
Mx1-FAM [*]	CTTTCCTGGTCGCTGTGCA	

pb: pares de bases del producto de PCR. S: cebador sentido. A: cebador antisentido. * sonda Taqman. Las condiciones de PCR y secuencias de los cebadores y sondas son las publicadas por Jackson Laboratory (<https://www.jax.org/research-and-faculty/tools/cytogenetic-and-down-syndrome-modelsresource/protocols/cytogenic-qpcr-protocol>).

Para la detección de la mutación *rd1* en hembras Ts65Dn se utilizó el protocolo descrito en Pittler, y Baehr (1991), que consiste en amplificar el locus *rd1* por PCR en las condiciones indicadas en la Tabla 2 y digerir el DNA amplificado durante 6-12 h con el enzima de restricción *Ddel*. Dado que la mutación *rd1* crea una nueva diana para este

enzima de restricción, los alelos silvestres y mutados se identificaron al correr el ADN digerido en un gel de agarosa al 2,5%.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1,5%. Para visualizar los fragmentos de DNA en los geles de agarosa se utilizó el lector GeneGenius Biomagin System (Syngene) acoplado a un ordenador con el software GeneSnap (Syngene).

2. Histología

En la realización de este trabajo se usaron embriones de 13,5 días de gestación (E13,5), animales postnatales de 7 (P7) y 14 (P14) días de vida y ratones macho adultos de 2-9 meses de edad.

2.1. Preparación de las muestras

Para obtener secciones de cerebro embrionario, las hembras preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical. Los úteros se colocaron en una placa de Petri que contenía tampón fosfato salino (PBS), pH = 7,4, a 4 °C y se procedió a obtener los embriones. Las cabezas se fijaron por inmersión en paraformaldehído (PFA) al 4% disuelto en PBS. Después de 24 h de fijación a 4°C, se diseccionaron las cabezas fijadas en una placa de Petri con PBS frío (4°C).

Para obtener secciones de cerebro postnatal y adulto, los ratones fueron profundamente anestesiados con dióxido de carbono (CO₂) y fijados mediante perfusión transcardíaca con PFA al 4% a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, los cerebros fueron extraídos y post-fijados a 4°C en PFA al 4% durante 24 h.

Los cerebros fijados se lavaron en PBS y fueron procesados para obtener secciones en un criostato o en un vibrátomo. Para secciones en criostato, los cerebros fueron crioprotegidos en PBS al 30% de sacarosa a 4°C durante 1 o 2 días. Los cerebros postnatales (P7 y P14) y adultos fijados y crioprotegidos se congelaron por inmersión en isopentano (Panreac) previamente enfriado en hielo seco (entre -20°C y -25°C). Posteriormente, se obtuvieron secciones coronales de 30 µm para los ratones P7 y de 40-45 µm en el caso de los ratones P14 y adultos. Las secciones se obtuvieron con un micrótopo de deslizamiento Leica SM2010R y se recogieron en placas de 48 pocillos que contenían solución crioprotectora (40% de etilenglicol y 40% de glicerol en PBS). Esta solución permite la conservación del tejido durante largo tiempo a -20°C.

Para secciones en vibrátomo, los cerebros de los embriones E13,5 y de los ratones P7 y adultos se almacenaron en PBS a 4°C hasta que fueron embebidos en una solución de 4% de agarosa en PBS y cortados en secciones coronales de 45 µm en un vibrátomo Leica VT1000S. Las secciones fueron recogidas en placas de 48 pocillos que contenían solución crioprotectora y guardadas hasta su utilización a -20°C.

2.2. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

2.2.1. Protocolo general

En el marcaje mediante inmunohistoquímica se usó el método de la avidina-biotina-peroxidasa (kit ABC Vectastain, Vector Labs). En este caso, después de lavar las secciones en PBS, la actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó en una solución de 3% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y 10% de metanol en PBS durante 30 min a TA. Las secciones fueron permeabilizadas durante 40 min en 0,2% de Tritón X-100 en PBS y después se incubaron en solución de bloqueo (SB: 0,2% de Tritón X-100 y 10% de suero bovino fetal (SBF) en PBS) durante 1 h a TA. Las incubaciones de las muestras con anticuerpo primario se realizaron a 4°C, durante 24-48 h, según el anticuerpo, en solución incubadora (SI: 0,2% de Tritón X-100 y 5% de FBS en PBS). Tras 3 lavados en PBS-Tritón X-100 al 0,2%, las secciones se incubaron en SI durante 1 h a 4°C con el correspondiente anticuerpo biotinilado; anti-IgG de conejo, anti-IgG de ratón, anti-IgG de cobaya o anti-IgG de rata (Vector Labs; dilución 1:250). Posteriormente, se realizaron varios lavados y las secciones se incubaron con la solución avidina-biotina-peroxidasa del kit de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para visualizar la actividad peroxidasa las secciones se incubaron en 0,1M Tris (pH = 7,4) con 0,03% de diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich) y 0,003% de H_2O_2 durante 5-15 min. Posteriormente, se tiñeron los núcleos realizando una contratinción con Nissl (0,5% de violeta de cresilo, pH = 3,6), y las secciones se deshidrataron con alcoholes y se montaron en medio de montaje Eukitt (Sigma-Aldrich).

Para inmunofluorescencia, las muestras fueron lavadas en PBS y permeabilizadas con 0,2% Tritón X-100 en PBS tal como se describe anteriormente. Para el inmunomarcaje con algunos anticuerpos (ver Tabla 4) fue necesario realizar un tratamiento de exposición del antígeno antes de la permeabilización del tejido. Este tratamiento consistió en sumergir las secciones de tejido durante 10 min en tampón citrato (ácido cítrico monohidrato 2 mM, citrato trisódico dihidrato 8 mM, pH = 6). La incubación de las muestras con anticuerpo primario se alargó hasta 4 días para aquellos anticuerpos, como el anti-VGLUT1 y anti-VGAT, que no penetran bien en el tejido. Tras la incubación con anticuerpo primario se realizaron 4 lavados en PBS-Tritón X-100 al 0,2% y, posteriormente, el tejido se incubó con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con un fluoróforo (Alexa Fluor de Life Technologies, dilución 1:1000) o con biotina (Vector Labs, dilución 1:300) en SI durante 1 h a TA. Cuando se utilizaron anticuerpos biotinilados, se realizó una segunda incubación en SI que contenía estreptavidina conjugada con Alexa Fluor-488 (Life Technologies, dilución 1:1000). Los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst o DAPI (Sigma-Aldrich) y las

secciones fueron montadas en Vectashield (Vector Labs) excepto en las inmunofluorescencias realizadas con marcadores de sinapsis (ver apartado 2.2.4.) que se montaron en 97% 2,2'-Thiodiethanol (TDE, Sigma-Aldrich) y 3 % H₂O (Staudt y col., 2007). Este medio de montaje se utilizó con el propósito de minimizar la aberración cromática pues tiene el mismo índice de refracción (IR = 1,515) que el aceite de inmersión generalmente utilizado en microscopía.

Los anticuerpos primarios usados en inmunohistoquímica y en inmunofluorescencia se detallan en la Tabla 4. En todos los casos se realizó un control sin anticuerpo primario y las muestras de animales de diferente genotipo fueron procesadas en paralelo.

Tabla 4. Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Especie de origen	Casa comercial (Referencia)	Dilución
Calretinina	Conejo	Swant (7699/4)	1:3000
cFos	Conejo	Calbiochem (PC38)	1:20000
Ctip2 ^B	Rata	Abcam (ab18465)	1:250
GABA	Conejo	Sigma-Aldrich (A2052)	1:200
Gefirina ^{A, B}	Ratón	Synaptic Systems (147 011)	1:500
Homer ^{A, B}	Ratón	Thermo Scientific (MA1-045)	1:1000
L1	Rata	Millipore (MAB5272)	1:350
Mef2c ^B	Conejo	Abcam (ab64644)	1:250
NeuN	Ratón	Chemicon (MAB377)	1:1000
NPY	Conejo	Inmunostar (22940)	1:10000
Nurr1 (E20)	Conejo	Santa cruz (sc-990)	1:500
Parvalbumina	Ratón	Sigma-Aldrich (P 3088)	1:1000
Somatostatina	Rata	Chemicon (AB5494)	1:200
TAG1 (4D7)	Ratón	DSHB (Hybridoma Bank)	1:300
VGAT ^A	Conejo	Synaptic Systems (131 003)	1:400
VGlut1 ^B	Cobaya	Millipore (AB5905)	1:700
VIP	Conejo	Inmunostar (20077)	1:11000

A: Anticuerpos amplificados con estreptavidina conjugado con Alexa flúor-488. B: Tratamiento con citrato.

2.2.2 Inmunomarcaje de células

En este trabajo hemos utilizado anticuerpos específicos de un marcador general de neuronas (NeuN; Mullen y col., 1992), de un marcador de neuronas inhibitoras (GABA), de marcadores de subtipos de neuronas corticales excitadoras (Ctip2; Arlotta y col., 2005) y Mef2c; Leifer y col., 1993) e inhibitoras (PV, SST, CR, VIP y NPY; Tremblay y col., 2016), de un marcador de neurona de subplaca (Nurr1; Arimatsu y col., 2003) y, de un marcador de actividad neuronal (c-Fos; Caubet, 1989; Morgan y col., 1987). Los inmunomarcajes en animales postnatales (P7 y P14) se realizaron en secciones coronales de criostato o vibrátomo (1 de cada 3 secciones) tomadas desde el inicio de la fimbria hasta el inicio del hipocampo según el atlas de Paxinos y Frankin (2001). En animales adultos (2-5 meses de edad), los inmunomarcajes se realizaron en 1 de cada 6 secciones. En este caso, los inmunomarcajes en la corteza somatosensorial (CSS) se realizaron en secciones comprendidas entre bregma -0,22 mm hasta bregma -0,94 mm y, los del hipocampo en secciones entre bregma -1,34 mm hasta bregma -2.18 mm según el atlas Paxinos y Frankin (2001).

Los inmunomarcajes de neuronas NeuN+, GABA+, Ctip2+ y Mef2c+ se realizaron mediante inmunofluorescencia y los de neuronas PV+, SST+, CR+, VIP+, NPY+, Nurr1+ y c-Fos+ mediante inmunohistoquímica. Todos los inmunomarcajes se realizaron en un mínimo de 3 secciones por animal y en 3 animales o más por genotipo analizado: mBACTg*Dyrk1a*, *Dyrk1a*^{+/-}, Ts65Dn y sus respectivos controles de camada.

2.2.3. Inmunomarcaje de proyecciones cortico-talámicas

El inmunomarcaje de las proyecciones cortico-talámicas se realizó mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos de las proteínas axonales TAG1 (Yamamoto y col., 1986) y L1 (Fushiki y Schachner, 1986). Las inmunofluorescencias se realizaron en secciones coronales (1 de cada 2 secciones) del telencéfalo de embriones mBACTg*Dyrk1a*, *Dyrk1a*^{+/-} y controles de camada a E13,5 en un mínimo de 3 animales por genotipo, utilizando los anticuerpos secundarios (ver información en Tabla 4): anti-IgM de ratón biotinilado producido en cabra (Vector Labs; dilución 1:300) e incubado posteriormente en estreptavidina conjugada con Alexa Fluor-488 (Life Technologies; dilución 1:1000) para el marcaje de TAG1; y anti-IgG de rata producido en burro conjugado con Alexa Fluor-594 (Life Technologies; dilución 1:1000) para el marcaje L1.

2.2.4. Inmunomarcaje de sinapsis

Para marcar sinapsis se han utilizado anticuerpos específicos de proteínas pre- y post-sinápticas de las sinapsis excitadoras e inhibitoras. Como marcadores pre-sinápticos se usaron dos transportadores vesiculares: el transportador vesicular de glutamato 1 (VGLUT1) para las sinapsis excitadoras y, el transportador vesicular de GABA (VGAT) para las inhibitoras. En el caso del componente post-sináptico se usaron marcadores de proteínas de andamiaje: Homer (Brakeman y col., 1997) para las sinapsis excitadoras y Gefirina (Prior y col., 1992) para las sinapsis inhibitoras. Los anticuerpos (ver información en Tabla 4) se utilizaron en experimento de inmunofluorescencia doble: anti-VGLUT1 y anti-Homer para marcar sinapsis excitadoras y, anti-VGAT y anti-Gefirina para marcar sinapsis inhibitoras. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-IgG de cobaya producido en cabra conjugado con Alexa Fluor-568 (Life Technologies; dilución 1:2000) para VGLUT1; anti-IgG de conejo producido en burro conjugado con Alexa Fluor-568 (Life Technologies; dilución 1:2000) para VGAT; y anti-IgG de ratón biotinilado producido en caballo (Vector Labs; dilución 1:300) para Homer y Gefirina, que posteriormente se incubaron con estreptavidina conjugada con Alexa Fluor-488 (Life Technologies; dilución 1:2000).

Las inmunofluorescencias se realizaron en secciones coronales de vibrátomo de ratones adultos *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} (n = 6 por genotipo) de nueve meses de edad. Para las inmunofluorescencias de la CSS se utilizaron secciones comprendidas entre las coordenadas bregma -0.22 mm hasta bregma -0.94 mm y, para las del hipocampo secciones entre bregma -1.70 mm hasta bregma -2.06 mm según el atlas de Paxinos y Frankin (2001).

2.3. Microscopía y análisis de imágenes

El estudio de microscopía se realizó en la Unidad Avanzada de Microscopía de Fluorescencia del Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC) exceptuando los estudios realizados con el microscopio Olympus BX51 que se realizaron en el Centre de Regulació Genómica (CRG) de Barcelona.

2.3.1. Adquisición de las imágenes de inmunohistoquímica

Las imágenes de inmunohistoquímica de la corteza de ratones P7 y adultos fueron adquiridas en un microscopio invertido Leica DMI6000, motorizado en XYZ, y acoplado a una cámara a color DFC550. Para visualizar áreas más grandes, las imágenes se adquirieron en mosaico utilizando óptica de bajo aumento, en concreto un objetivo 10x (A.N = 0,30), a excepción de los ratones P14 en los que se empleó un 20x (A.N = 0,50). El software utilizado para la adquisición y la fusión de las imágenes individuales en mosaicos fue el Leica LAS_X. Por otro lado, las imágenes de la CSS de ratones P14 se adquirieron en un microscopio Olympus BX51 acoplado a una cámara a color JVC y con un objetivo seco 40x (A.N = 0,65).

El procesamiento de las imágenes se realizó con los programas ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) y Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Incorporated).

2.3.2. Adquisición y análisis de las imágenes de inmunofluorescencia

Las imágenes de inmunofluorescencia de los embriones E13,5 y de los ratones P7 y adultos utilizadas para visualizar fibras y realizar recuentos de neuronas fueron adquiridas en un microscopio invertido Leica DMI6000, motorizado en XYZ, y acoplado a una cámara CCD ORCA-R2. Al igual que en las muestras de inmunohistoquímica, se empleó el sistema de adquisición en mosaico con un objetivo 10x (A.N = 0,30), a excepción de los embriones E13,5 en que se utilizó el objetivo 20x (A.N = 0,5). La adquisición y ensamblaje de las imágenes individuales en mosaico se realizó con el software Leica LAS_X.

Las imágenes utilizadas para el recuento de sinapsis en ratones adultos fueron adquiridas en el microscopio confocal Zeiss LSM 780 utilizando un objetivo Plan Achromat 63x de inmersión en aceite (A.N. = 1,4). Para agilizar la captura de imágenes multicanal se seleccionó el modo de escaneo secuencial en línea, utilizando las longitudes de onda de excitación 405, 488 y 561 nm, y los anchos de banda de 415-491, 490-553 y 568-735 nm para los tres respectivos detectores. Para minimizar el foto-blanqueo de la fluorescencia e incrementar la relación señal-ruido de las imágenes se seleccionaron ganancias inferiores a 800 y una velocidad de escaneo intermedia de 3,15 μ s por píxel. Con el fin de optimizar la resolución de las imágenes se emplearon las aperturas de detección confocal 0,77, 0,66 y 0,53 unidades de *airy* (AU, *airy units*) para los tres canales respectivamente, y se ajustó el tamaño de píxel a 50 nm, en imágenes de 512 x 512 píxeles. Por último, para evitar

variaciones debidas a la distinta penetración de los anticuerpos en el tejido, el muestreo se llevó a cabo en imágenes de una sola sección Z, a unos 8 μm de profundidad, donde la señal de todos los marcajes resultó ser óptima. Para cada tipo de análisis (región del cerebro y tipo de sinapsis) todas las imágenes, independientemente del individuo y el corte, se capturaron utilizando los mismos parámetros de adquisición, previamente calibrados para garantizar que los niveles de señal de todas las muestras quedasen incluidas dentro de los límites del rango dinámico de detección del sistema.

El procesamiento general de las imágenes se realizó en ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) y Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Incorporated).

2.4. Recuento de células en la corteza somatosensorial y el hipocampo

En este trabajo hemos estimado el número de diferentes poblaciones neuronales en la CSS y el hipocampo de ratones postnatales y adultos de diferentes genotipos cuantificando las células inmunomarcadas con anticuerpos específicos sobre imágenes de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica adquiridas según se describe en los apartados anteriores. El recuento de células se realizó manualmente en ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), mediante el módulo adicional de software "*Cell counter*". Por otro lado, las cuantificaciones en la CSS de ratones P14 se realizaron manualmente en imágenes de inmunohistoquímica utilizando un microscopio Olympus BX51 con el objetivo seco 40x (A.N = 0,65), acoplado a una cámara a color JVC con el software CAST-GRID (Computer Assisted Stereological Tollbox for PCs running Microsoft® Windows™) de Olympus (Glostrup, Dinamarca).

Los recuentos de células en la neocorteza se realizaron en un rectángulo de tamaño variable, definido según el tipo neuronal y el estadio del desarrollo, que abarcaba desde el ventrículo hasta la capa más alta (capa II-III) de la CSS (ver Fig. 11A-B). La anchura del rectángulo (columna) se definió de antemano en función de la abundancia del tipo celular inmunomarcado. Los recuentos de las neuronas que expresan NeuN, Ctip2 y Mef2c en la neocorteza de ratones P7 se realizaron sobre imágenes de inmunofluorescencia. Las células NeuN+ se contaron en un rectángulo de 150 μm de ancho. Las células Ctip2+ y Mef2c+ se contaron en un rectángulo de 350 μm de ancho sobre imágenes de doble inmunomarcaje. Las células inmunorreactivas para PV, SST y CR de la CSS de ratones P14 se contaron en un rectángulo de 600 μm de ancho sobre imágenes de inmunohistoquímica. Las cuantificaciones de células que expresaron los marcadores PV, SST, CR, VIP o NPY en

animales adultos se realizaron también sobre imágenes de inmunohistoquímica en un rectángulo de 600 μm de ancho. Los recuentos de las células que expresaron los marcadores neuronales NeuN y GABA se realizaron en un rectángulo de 150 μm de ancho (células NeuN+) o 300 μm de ancho (células GABA+) sobre imágenes de inmunofluorescencia doble.

Las células de la subplaca que expresaron los marcadores Nurr1 y NeuN en ratones P7 se contaron en un segmento de subplaca de 1000 μm ; las que expresan Nurr1 en imágenes de inmunohistoquímica y las que expresan NeuN en imágenes de inmunofluorescencia.

Los recuentos de células del hipocampo que expresan los marcadores c-Fos, PV, SST, CR, NPY y VIP se realizaron sobre imágenes de inmunohistoquímica en el GD y áreas CA1 y CA3 (ver Fig. 11C) de animales adultos de 4-6 meses de edad, para c-Fos, y de 2 meses de edad para el resto de marcadores.

Para cada animal se calculó la media de las células contadas en todas las secciones y el error estándar de la media (EEM). El coeficiente de error (CE) calculado según la fórmula $CE = EEM/\text{media}$ fue menor al 10% en la mayoría de los casos. Todos los recuentos se realizaron sin conocer los genotipos de los animales. Para definir las distintas capas de la neocorteza y del hipocampo, los núcleos se marcaron con Nissl (inmunohistoquímica) o con Hoechst (inmunofluorescencia).

2.5. Recuento de sinapsis en la corteza somatosensorial y el hipocampo

El recuento de las sinapsis en la CSS se realizó sobre imágenes adquiridas al azar en las capas IV y VI (20 imágenes de 26 μm^2 por cada capa y hemisferio; ver Fig. 12A) en tres secciones por animal: una sección anterior (entre bregma -0,22 y bregma -0,34 mm), otra medial (entre bregma -0,46 y bregma -0,70 mm) y otra caudal (entre bregma -0,82 y bregma -0,94 mm). El recuento de sinapsis en el hipocampo se realizó en el *stratum radiatum* del área CA1 sobre imágenes adquiridas al azar en dos subregiones: una dorsal y otra ventral (10 imágenes de 26 μm^2 por subregión y hemisferio; ver Fig. 12B). En el caso del hipocampo el recuento de sinapsis se realizó en dos secciones por animal.

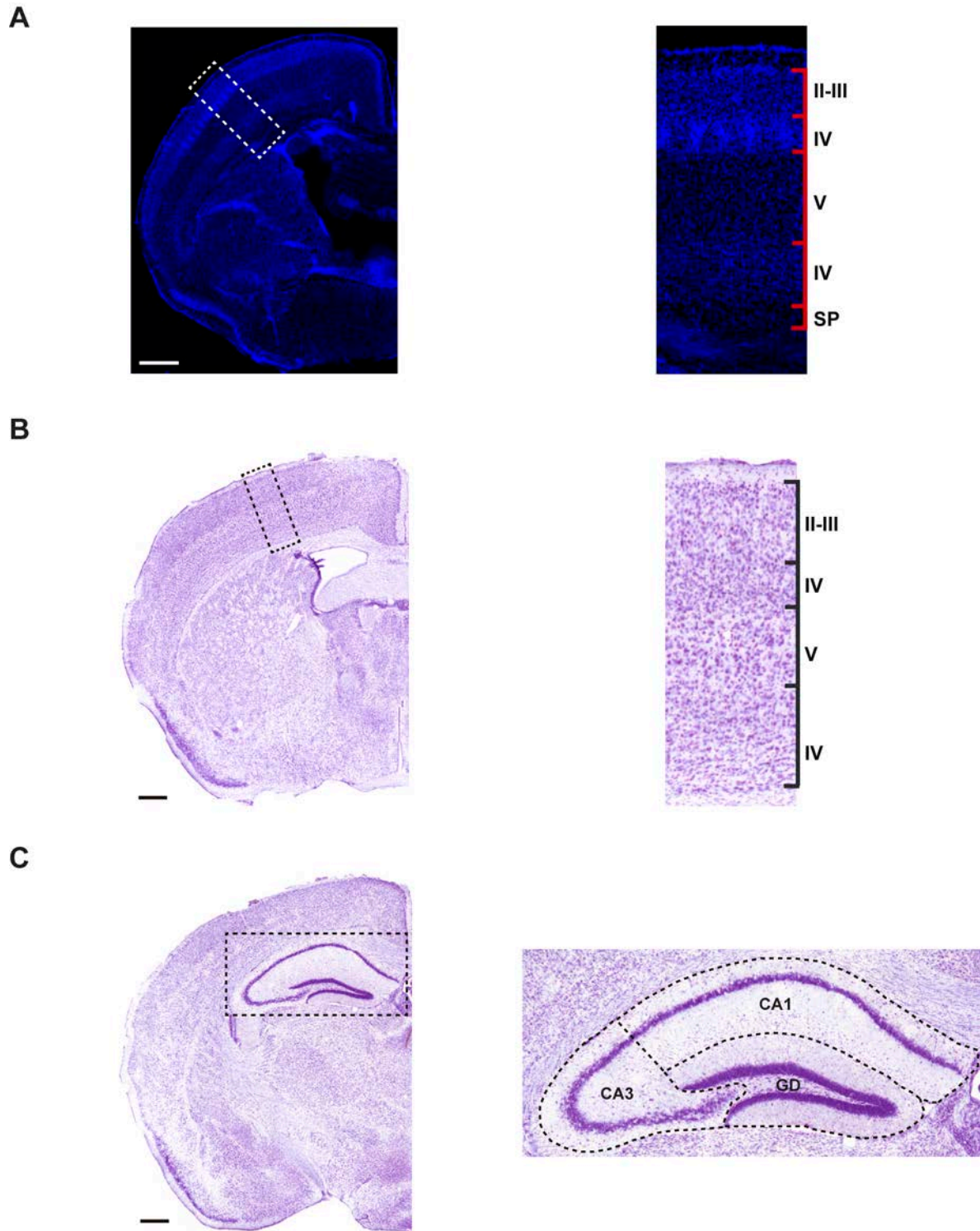


Figura 11. Áreas de cuantificación de neuronas en ratones postnatales y adultos. (A) Imagen representativa de una sección coronal de cerebro de ratón control a P7 con los núcleos teñidos con Hoechst. A la derecha se amplia la sección de la corteza somatosensorial (CSS) donde se han realizado las cuantificaciones. En ella se observa la subplaca (SP) y las seis capas (capas II-III a VI) de la corteza. **(B y C)** Imágenes representativas de secciones coronales de cerebro de ratón control adulto con los núcleos teñidos con Nissl utilizadas para las cuantificaciones de neuronas en la CSS **(B)** y el hipocampo **(C)**. Las imágenes de la derecha corresponden a ampliaciones de la región de la CSS **(B)** y del hipocampo: CA1, CA3 y giro dentado (GD) **(C)** donde se han realizado las cuantificaciones. Las cuantificaciones de neuronas en la CSS se realizaron en rectángulos (columnas) de 100-1000 μm de ancho como las mostradas en **A** y **B**. Barra de escala en **A**: 300 μm ; **B y C**: 500 μm .

La cuantificación de las sinapsis se llevó a cabo mediante un algoritmo de procesamiento automatizado escrito en ImageJ/Fiji bajo el código del lenguaje de macro incorporado en el programa. El algoritmo calcula el número de coincidencias espaciales entre los marcadores verde (post-sináptico, Homer o Gefirina) y rojo (pre-sináptico, VGLUT1 o VGAT) con un margen de detección adicional de 80 nm de radio desde el borde de la partícula y excluyendo los núcleos del área global analizada. La secuencia de tareas del algoritmo incluye: 1) separación de canales, filtrado de la señal fluorescente y corrección del ruido; 2) detección y segmentación de los núcleos para su posterior exclusión del área de análisis; 3) segmentación de los focos de señal verde (correspondientes al componente post-sináptico) y eliminación de todas las partículas resultantes coincidentes con núcleos y bordes de la imagen; 4) filtrado adicional de las partículas resultantes utilizando criterios de tamaño, densidad de intensidad y circularidad, para descartar todas aquellas que son potencialmente ruido o artefactos; 5) establecimiento del área de interacción de cada una de las partículas seleccionadas, utilizando una extensión adicional de 80 nm de radio desde el borde de la partícula; 6) corrección del desplazamiento lateral de la señal roja con respecto a la verde debido a la aberración cromática residual; la distancia de corrección se estimó previamente en imágenes de microesferas fluorescentes de 100 nm (Tetraspek, Molecular Probes) montadas y capturadas bajo las mismas condiciones de filmación al confocal; 7) selección y conteo de todas aquellas partículas verdes en cuyo área de interacción se detectó la señal del marcador rojo por encima de un umbral establecido, lo que indica la coincidencia espacial de los dos componentes pre- y post-sinápticos en una distancia compatible con la sinapsis (ver Fig. 12C).

El algoritmo descrito permite establecer *a priori* los criterios de selección de las partículas post-sinápticas y los umbrales de señal de las pre-sinápticas, y procesar automáticamente todas las imágenes de cada grupo de análisis, devolviendo los contajes del número total de partículas seleccionadas y el de coincidencias (sinapsis) detectadas, dentro de un área real de trabajo que excluye las regiones nucleares. Este algoritmo permitió establecer criterios homogéneos de selección de manera que, en todos los análisis efectuados, la relación entre el número de partículas seleccionadas y el número final de sinapsis detectadas fuese del 90%, siendo el 10% restante atribuible a la distinta orientación del marcador pre-sináptico con respecto al plano focal adquirido. Este procedimiento permitió analizar de forma automatizada un total de aproximadamente 7000 imágenes con criterios uniformes de selección, contribuyendo a minimizar el error experimental y mantener los tamaños de las muestras óptimos para el análisis de varianzas. El total de las imágenes analizadas fueron los siguientes: en la CSS el número de imágenes de sinapsis excitadoras

(capa IV: $Dyrk1a^{+/+} = 639$, $Dyrk1a^{+/-} = 661$; capa VI: $Dyrk1a^{+/+} = 639$, $Dyrk1a^{+/-} = 643$); número de imágenes de sinapsis inhibitoras (capa IV: $Dyrk1a^{+/+} = 601$, $Dyrk1a^{+/-} = 539$; capa VI: $Dyrk1a^{+/+} = 615$, $Dyrk1a^{+/-} = 535$). En el caso del *stratum radiatum* de la región CA1: el número de imágenes de sinapsis excitadoras ($Dyrk1a^{+/+} = 647$, $Dyrk1a^{+/-} = 470$); número de imágenes de sinapsis inhibitoras ($Dyrk1a^{+/+} = 466$, $Dyrk1a^{+/-} = 437$).

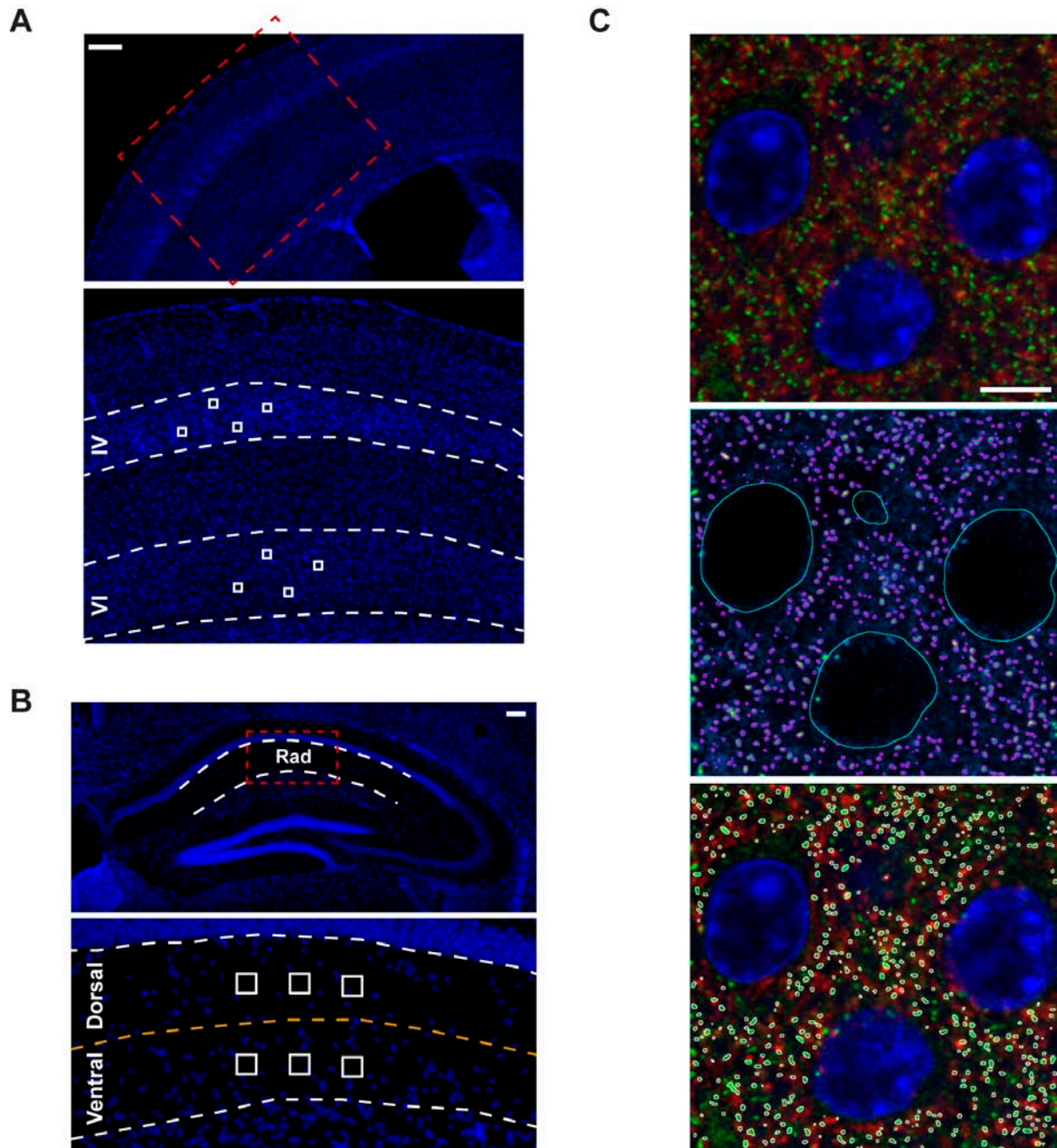


Figura 12. Áreas de cuantificación de las sinapsis excitadoras e inhibitoras en ratones adultos. (A, B) Secciones coronales del cerebro de un ratón control a la altura de la CSS **(A)** y del hipocampo **(B)** donde se observan los núcleos teñidos con DAPI. La imagen inferior en **A** es una ampliación de la región de la CSS marcada con un rectángulo rojo en la fotografía superior. Los rectángulos en esta imagen indican la posición aleatoria de las 20 imágenes utilizadas para estimar el número de sinapsis en las capas IV y VI de la neocorteza. La imagen inferior en **B** es una ampliación del recuadro en rojo correspondiente al *stratum radiatum* de la región CA1 del hipocampo en la fotografía superior donde se indica el área muestreada en la zona dorsal y ventral (10 imágenes por zona) para estimar el número de sinapsis en esta región. **(C)** Imágenes que ilustran el proceso seguido para estimar el número de sinapsis en las regiones de interés (ver apartado 2.5 en Materiales y Métodos). La imagen superior muestra partículas Homer inmunopositivas (verde), VGLUT1 inmunopositivas (rojo) y 4 núcleos teñidos con DAPI (azul) antes de ser procesadas para estimar las coincidencias espaciales del componente pre y post-sináptico marcado. La imagen central muestra el área de análisis después de segmentar los núcleos e indica las partículas post-sinápticas (verdes) después del filtrado de las mismas según criterios de tamaño, circularidad e intensidad. La imagen inferior muestra el número final de interacciones (sinapsis) VGLUT1/Homer. Barra de escala en **A**: 300 μ m; **B**: 200 μ m; **C**: 5 μ m.

3. Pruebas neuroconductuales

Las diferentes pruebas de análisis neuroconductual se realizaron durante el fotoperiodo de luz entre las 9:30 y las 15:30. En todas ellas se usaron ratones machos *Dyrk1a*^{+/-} adultos de 4 meses de edad y sus controles de camada *Dyrk1a*^{+/+}. Los animales fueron estabulados en jaulas estándar dentro de racks ventilados junto a sus hermanos de camada. Dos días antes de iniciar las pruebas de comportamiento, y con el objetivo de reducir el estrés derivado de la manipulación, se realizaron diversas sesiones de habituación que consistieron en la manipulación diaria de cada ratón durante al menos 2 min. Además, 30 min antes de iniciar cada prueba conductual, los animales se trasladaron a la habitación experimental para acostumarlos al nuevo ambiente. Todos los objetos usados en las pruebas se limpiaron cuidadosamente con una solución jabonosa inodora antes y después de su uso. Las pruebas se realizaron en un orden establecido, de la menos aversiva a la más aversiva. Primero se realizó la prueba de las canicas enterradas y tres semanas después se realizó la prueba de interacción social o del residente-intruso. Los grupos de animales para cada sesión de comportamiento se llevaron a cabo siguiendo una distribución aleatoria. Todas las pruebas fueron registradas en video mediante una cámara CCTV (Sony corporation) anclada en el techo de la sala y conectada al software de seguimiento SMART 3.0 (Panlab Harvard Apparatus). Los videos fueron posteriormente analizados en ciego, es decir sin conocer el genotipo del ratón.

3.1. Prueba de las canicas enterradas

Esta prueba se usa para analizar el comportamiento ansioso y el comportamiento repetitivo o persistente (Silverman y col., 2010; Thomas y col., 2009). Para la realización de esta prueba se utilizaron unas jaulas de mayor tamaño que las de estabulación (17,5 x 24,5 x 42,5 cm) con una base de 5 cm de viruta limpia en su interior. Sobre la viruta se depositaron 12 canicas de vidrio de 15 mm de diámetro distribuidas en dos filas. La duración de la prueba fue de 20 min, iniciándose al depositar el ratón en una esquina de la jaula. Para cada ratón contabilizamos el número de canicas enterradas durante cuatro períodos de 5 min cada uno. Las canicas se consideraron enterradas cuando más del 90% de su superficie estaba cubierta por viruta. Esta prueba se realizó con 15 animales por genotipo. Además en esta prueba se contabilizaron el número, la duración, la naturaleza (enterramientos realizados con las patas delanteras, también denominados enterramientos defensivos; o con ayuda de las patas traseras, enterramientos no defensivos) y el lugar donde se realizaban

los enterramientos, tanto si enterraban canicas como si no lo hacían. También se cuantificó el tiempo que permanecían tanto en el centro de la jaula como en la periferia de la jaula que estaba libre de canicas. De manera adicional, se contabilizaron el número y el tiempo dedicado en realizar autoacicalamientos con una duración igual o mayores a 3 s; y los contactos olfativos realizados en las canicas que se acompañaban de mordiscos y movimientos de las mismas con las patas delanteras.

3.2. Prueba de interacción social o del residente-intruso

La prueba de interacción social, también denominada *prueba del residente-intruso*, evalúa la interacción social de los animales y es una modificación de la prueba de interacción social recíproca descrita por Lin y Hsueh (2014). Esta prueba se realizó en el mismo tipo de jaulas estándar donde se estabulan los ratones en los racks ventilados (12.5 x 17.5 x 32.5 cm). Para la prueba se utilizaron jaulas limpias con 5 cm de viruta en su interior (75% de viruta nueva y 25% de viruta de la jaula de estabulación del ratón objeto de estudio, al que llamamos “residente”). La prueba se compone de dos fases, una primera fase de familiarización seguida de la fase en la que se evalúa la interacción social. En la primera fase, el ratón residente se deposita en la jaula y se le permite inspeccionarla durante 5 min. Transcurrido ese tiempo, se añade a la jaula un ratón control (al que llamamos ratón intruso), del mismo acervo genético y edad que el ratón residente y se permite la libre interacción entre ellos. Durante los 5 min que dura la segunda fase se cuantificaron las interacciones iniciadas por el ratón residente. Éstas se clasificaron en: contactos olfativos (contacto oral-oral u oral-genital) y contactos agresivos con o sin presencia de mordiscos. En esta segunda fase, también se cuantificaron los acicalamientos de duración mayor o igual a 3 s y las excavaciones en la viruta realizadas por el ratón residente. Los experimentos se grabaron con la cámara de video desde el lateral de la jaula. Los animales residentes evaluados fueron 12 animales *Dyrk1a*^{+/-} y 13 animales *Dyrk1a*^{+/+}. Todas las evaluaciones se realizaron utilizando el mismo animal intruso.

4. Análisis estadístico

Los datos del recuento del número de sinapsis se analizaron mediante la prueba de ANOVA univariante mixto de efectos fijos y aleatorios (modelo general lineal, MGL). Los datos de las pruebas neuroconductuales se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney. El resto de los datos fueron analizados mediante la prueba T de Student de dos colas. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics (versión 22). Las diferencias fueron consideradas significativas con valores de $p < 0.05$: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

OBJETIVOS

El **objetivo principal** de esta tesis doctoral es analizar la implicación de la pérdida y ganancia de función del gen del cromosoma 21 humano *DYRK1A* en la citoarquitectura y función de la corteza cerebral con la finalidad de aportar evidencias sobre las bases neuropatológicas del SD y del síndrome de DI causado por mutaciones *de novo* en el gen *DYRK1A*. Para alcanzar este objetivo se han utilizado ratones que modelan estos dos síndromes y tienen una o tres copias funcionales del gen *Dyrk1a*.

Los **objetivos concretos** que se detallan a continuación se formularon durante la realización de este trabajo teniendo en cuenta los resultados que se iban obteniendo y los datos publicados por otros grupos de investigación. Estos objetivos son:

1. Determinar posibles alteraciones en la celularidad de la subplaca y el establecimiento de las conexiones cortico-talámicas en ratones mutantes de *Dyrk1a*.
2. Determinar posibles alteraciones en la densidad de distintos tipos de neuronas excitadoras (glutamatérgicas) e inhibitoras (GABAérgicas) en la neocorteza postnatal de los ratones mutantes *Dyrk1a*.
3. Determinar la proporción de neuronas excitadoras e inhibitoras en la neocorteza de ratones mutantes *Dyrk1a* adultos.
4. Cuantificar los principales subtipos de neuronas inhibitoras en la neocorteza e hipocampo de los ratones adultos *Dyrk1a*^{+/-} con una copia funcional del gen *Dyrk1a*.
5. Estimar el número de sinapsis excitadoras e inhibitoras en la neocorteza e hipocampo de los ratones adultos *Dyrk1a*^{+/-}.
6. Evaluar el comportamiento autista y el fenotipo epiléptico de los ratones adultos *Dyrk1a*^{+/-}.

RESULTADOS

1. Implicación de DYRK1A en las conexiones cortico-talámicas

Una de las primeras poblaciones de neuronas corticales que se generan en la zona ventricular del *pallium* dorsal son las neuronas de la subplaca (Fig. 3A). Estas neuronas tienen un papel fundamental en la formación de los circuitos corticales y extracorticales y sirven de guía a los axones procedentes del tálamo que llegan a la corteza (Hoerder-Suabedissen y Molnar, 2015).

Resultados previos del laboratorio han demostrado que la generación de neuronas en el *pallium* dorsal al inicio de la neurogénesis (E11-E13) está incrementada en los embriones mutantes *Dyrk1a*^{+/-} y reducida en los mutantes mBACTg*Dyrk1a*. En concordancia, los ratones mutantes *Dyrk1a* presentan alteraciones en el número de neuronas Tbr1+ que forman la capa VI de la neocorteza en estadios postnatales (Najas y col., 2015).

En este trabajo hemos evaluado si los defectos en neurogénesis temprana observada previamente en los embriones mutantes *Dyrk1a* tienen algún impacto en la formación de la subplaca, para ello hemos contado el número de neuronas de la subplaca en la CSS de ratones mBACTg*Dyrk1a*, *Dyrk1a*^{+/-} y sus respectivos controles de camada después de la neurogénesis, a P7, utilizando 2 marcadores neuronales: Nurr1, también denominado NR4A2 (*Nuclear Receptor subfamily 4 group A member 2*), con expresión abundante en las neuronas de la subplaca (Arimatsu y col., 2003) y, NeuN (*neuronal nuclei*), un marcador general de neuronas (Mullen y col., 1992). Los mutantes mBACTg*Dyrk1a* y *Dyrk1a*^{+/-} tienen subplaca y las células que componen esta capa presentaban una disposición similar a la de los ratones control hermanos de camada (Fig. 13A, C; Fig. 14A, C). Sin embargo, los recuentos de las células de la subplaca inmunomarcadas con Nurr1 y NeuN revelaron diferencias de celularidad entre genotipos. Los mutantes de sobre-expresión mBACTg*Dyrk1a* presentan un déficit de neuronas Nurr1+ y de neuronas NeuN+ en la subplaca (20%, $p = 0,008$, prueba T de Student, y 15%, $p < 0,010$, prueba T de Student, de reducción respectivamente en comparación a los controles; Fig. 13B, D), mientras que los mutantes de pérdida de función *Dyrk1a*^{+/-} presentan un exceso tanto de neuronas Nurr1+ como de neuronas NeuN+ en la subplaca (aproximadamente 30% de incremento respecto a los controles: Nurr1, $p < 0,001$, prueba T de Student; NeuN, $p < 0,001$, prueba T de Student; Fig. 14B, D). Estos defectos en la celularidad de la subplaca correlacionan con las alteraciones en la neurogénesis temprana observada previamente en el telencéfalo dorsal de los embriones mBACTg*Dyrk1a* y *Dyrk1a*^{+/-} (reducida en los primeros e incrementada en los segundos) y en el número de neuronas Tbr1+ (neuronas excitadoras) de la capa VI de la neocorteza en estos mutantes en estadios postnatales (Najas y col., 2015).

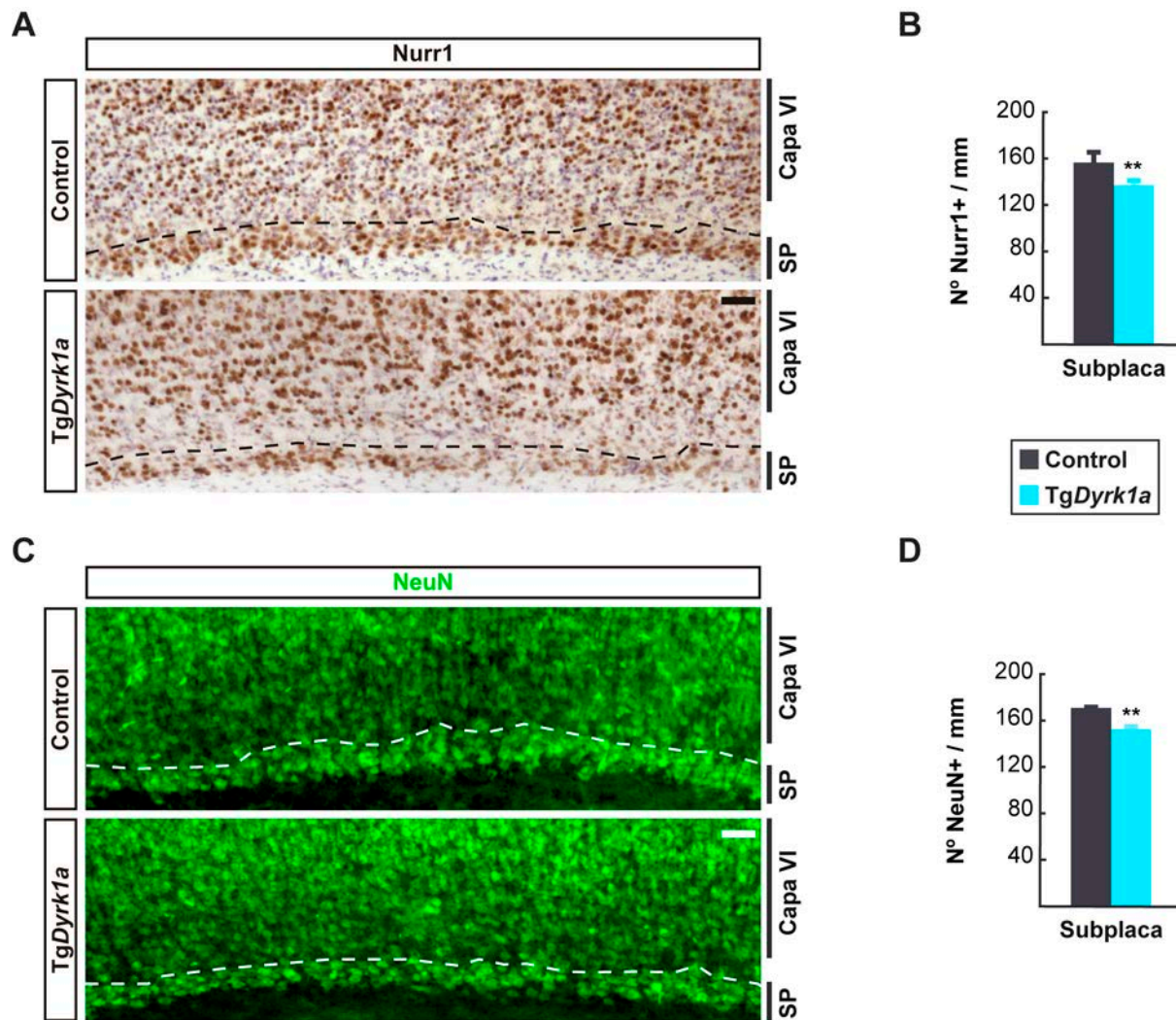


Figura 13. Número de neuronas de la subplaca en ratones postnatales (P7) mBACTgDyrk1a (TgDyrk1a) y controles de camada. (A, C) Imágenes representativas de la corteza somatosensorial (CSS) donde se observan neuronas Nurr1 inmunopositivas **(A)** y NeuN inmunopositivas **(C)** en la subplaca (SP) y en la capa VI de la CSS de ratones de los genotipos indicados. **(B, D)** Los histogramas muestran el número de células Nurr1+ **(B)** y NeuN+ **(D)** de la SP cuantificadas en una columna de la CSS de 1000 μm ancho. Los valores corresponden a la media \pm EEM. ** $p < 0,01$ (controles, $n = 3$; TgDyrk1a, $n = 5$). Barra de escala en **A** y **C**: 50 μm . SP: Subplaca.

En vista de los resultados obtenidos en el modelo mBACTgDyrk1a con tres copias del gen *Dyrk1a*, decidimos estudiar si la sobre-expresión de DYRK1A afecta la celularidad de la subplaca en el ratón trisómico modelo de SD Ts65Dn, que tiene en trisomía una región del MMU16 sinténica al HSA21 que incluye los genes ortólogos a la RCSD (ver capítulo 3.1.2 de Introducción; Davisson y col., 1990). Resultados previos del laboratorio demuestran que la producción de neuronas corticales excitadoras durante la neurogénesis temprana está significativamente disminuida en los embriones Ts65Dn (Najas y col., 2015), sugiriendo la posible alteración de la subplaca. Para ello realizamos las mismas inmunohistoquímicas anteriores en secciones de cerebro de animales postnatales (P7) controles (euploides),

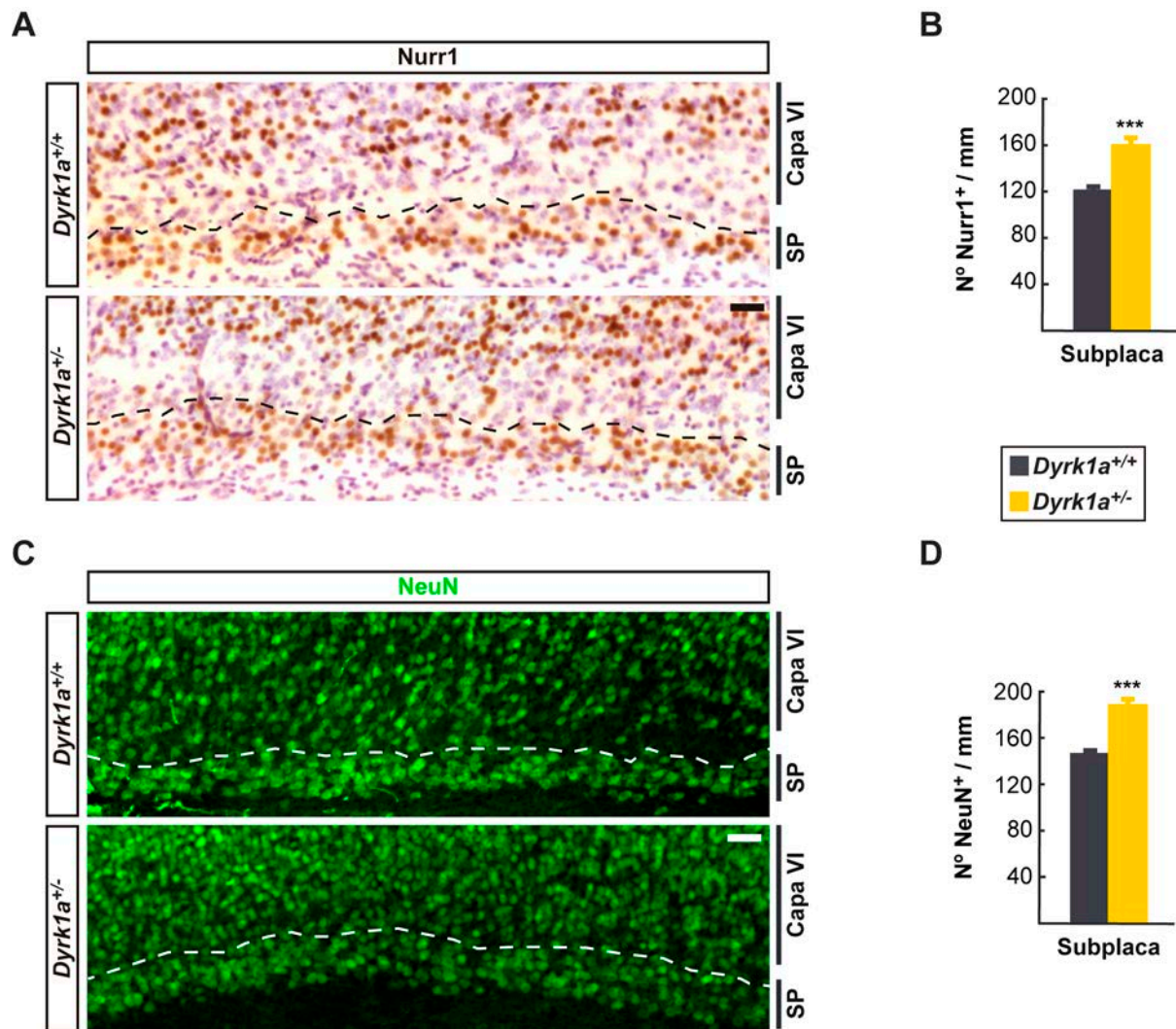


Figura 14. Número de neuronas de la subplaca en ratones postnatales (P7) *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-}. (A, C) Imágenes representativas de la corteza somatosensorial (CSS) donde se observan neuronas Nurr1 inmunopositivas (A) y NeuN inmunopositivas (C) en la subplaca (SP) y en la capa VI de la CSS de ratones de los genotipos indicados. (B, D) Los histogramas muestran el número de células Nurr1+ (B) y NeuN+ (D) de la SP cuantificadas en una columna de la CSS de 1.000 μ m ancho. Los valores corresponden a la media \pm EEM. *** $p < 0,001$ (*Dyrk1a*^{+/+}, $n = 5$; *Dyrk1a*^{+/-}, $n = 4$). Barra de escala en A y C: 50 μ m. SP: Subplaca.

trisómicos (Ts65Dn) y trisómicos con dos copias funcionales de *Dyrk1a* (Ts65*Dyrk1a*^{+/+}). Estos animales se obtuvieron al cruzar hembras Ts65Dn con machos *Dyrk1a*^{+/-} tal como se describe en Najas y colaboradores (2015; Fig. 15A). Al igual que ocurre con los mutantes *Dyrk1a*, no observamos diferencias entre ratones en la disposición de las neuronas Nurr1+ y NeuN+ de la subplaca en la CSS de ratones de los tres genotipos analizados; controles, Ts65Dn y Ts65*Dyrk1a*^{+/+} (Fig. 15A, C). Sin embargo, sí que observamos diferencias significativas entre genotipos al cuantificar las neuronas Nurr1+ y NeuN+ de la subplaca. Los ratones Ts65Dn mostraron una reducción del 25% en el número de neuronas Nurr1+ en comparación a los ratones control ($p < 0,001$, prueba T de Student; Fig. 15B) y una

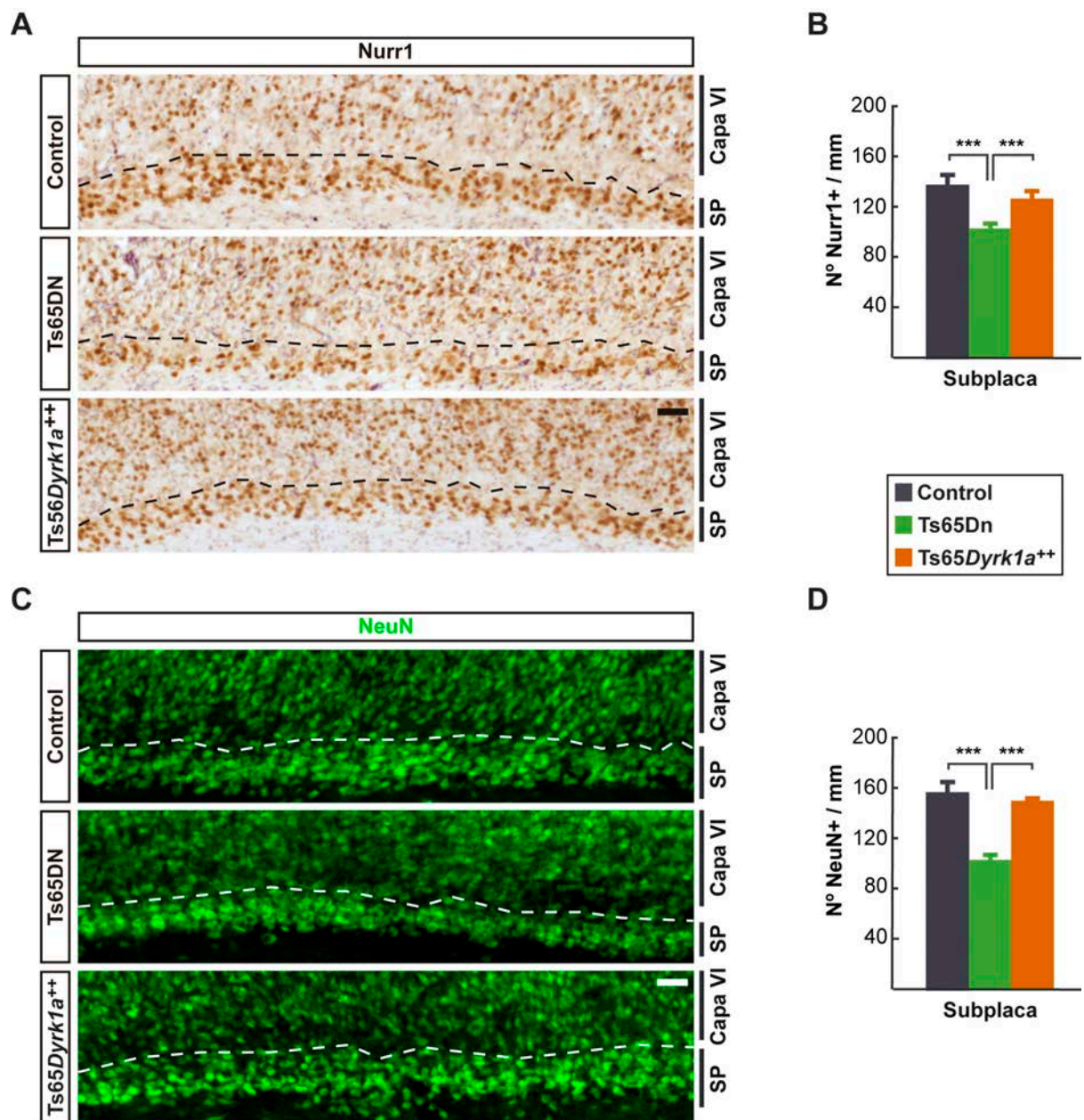


Figura 15. Número de neuronas de la subplaca en ratones postnatales (P7) Ts65Dn, Ts65Dyrk1a^{+/+} y controles euploides de camada. **(A, C)** Imágenes representativas de la corteza somatosensorial (CSS) donde se observan neuronas Nurr1 inmunopositivas **(A)** y NeuN inmunopositivas **(C)** en la subplaca (SP) y en la capa VI de la CSS de ratones de los genotipos indicados. **(B, D)** Los histogramas muestran el número de células Nurr1+ **(B)** y NeuN+ **(D)** de la subplaca (SP) cuantificadas en una columna de la CSS de 1000 μ m ancho. La disminución de neuronas en los ratones Ts65Dn (tres copias del gen *Dyrk1a*) se normaliza en los ratones Ts65Dyrk1a^{+/+} con una dosis normal del gen *Dyrk1a*. Los valores corresponden a la media \pm EEM. *** $p < 0,001$ (controles, $n = 4$; Ts65Dn, $n = 5$; Ts65Dyrk1a^{+/+}, $n = 5$). Barra de escala en **A** y **C**: 50 μ m. SP: Subplaca.

disminución del 35% ($p < 0,001$, prueba T de Student) en el número de neuronas NeuN+ (Fig. 15D). Este fenotipo es semejante al observado en secciones de cerebro de ratones mBACTg*Dyrk1a* (comparar Figs. 13 y 15). Además, el número de neuronas Nurr1+ y NeuN+

de la subplaca de la CSS de los ratones *Ts65Dyrk1a^{+/+}* incrementó hasta alcanzar valores semejantes al de los ratones control (*Nurr1*, $p = 0,299$, prueba T de Student; *NeuN*, $p = 0,494$, prueba T de Student; Fig. 15B, D). Estas cuantificaciones indican que la hipocelularidad de la subplaca en los ratones *Ts65Dn* es debida a la trisomía del gen *Dyrk1a*.

Una de la funciones de las neuronas de la subplaca es hacer de guía a los axones de las neuronas corticofugales que proyectan a zonas subcorticales. Las neuronas de la subplaca comienzan a extender sus axones por la zona intermedia hacia zonas subcorticales alrededor de E13 (Hoerder-Suabedissen y Molnar, 2015). Con el objetivo de determinar posibles anomalías en la diferenciación de las neuronas de la subplaca en los mutantes *Dyrk1a*, hemos realizado inmunofluorescencias en secciones de embriones *mBACTgDyrk1a* y *Dyrk1a^{+/-}* y sus respectivos controles de camada a E13,5 utilizando anticuerpos anti-TAG1 y anti-L1. TAG1 y L1 son moléculas de adhesión que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. TAG1 se expresa en las fibras neuronales en diferentes áreas del sistema nervioso (Yamamoto y col., 1986), y L1 se expresa los axones cortico-talámicos y en los talámico-corticales (Fushiki y Schachner, 1986). En los embriones controles se observan axones inmunomarcados con los anticuerpos anti-TAG1 (Fig. 16A) y anti-L1 (Fig. 17A) en la zona intermedia situada entre la placa cortical y la zona subventricular. También se observa inmunomarcaje en la placa cortical donde se sitúan las neuronas de la subplaca y de la futura capa VI de la neocorteza. Las fibras marcadas con anticuerpos anti-TAG1 en los embriones *mBACTgDyrk1a* (Fig. 16B) y en los embriones *Dyrk1a^{+/-}* (Fig. 16C) se acumulan también en la zona intermedia siguiendo la misma dirección que en los controles. Sin embargo, el inmunomarcaje con anti-TAG1 en la zona intermedia es menor en los embriones *mBACTgDyrk1a* y mayor en los embriones *Dyrk1a^{+/-}* respecto a sus controles (Figs. 16B, C), indicando posibles diferencias en el número de axones cortico-talámicos. También se observan diferencias en la misma dirección en el inmunomarcaje de la placa cortical con anti-TAG1; siendo éste menor en los embriones *mBACTgDyrk1a* y mayor en los *Dyrk1a^{+/-}* (Figs. 16B, C). El inmunomarcaje con anti-L1 en la placa cortical y la zona intermedia de los embriones *mBACTgDyrk1a* es también menor que en los controles (Fig. 17B). En su conjunto, estas inmunofluorescencias indican que neuronas de la subplaca en los embriones mutantes *Dyrk1a* extienden normalmente sus axones hacia las regiones subcorticales. Las diferencias de inmunorreactividad observadas entre genotipos están de acuerdo con el déficit de neuronas excitadoras (*Tbr1+*) en el telencéfalo dorso-lateral de embriones *mBACTgDyrk1a* y el exceso de neuronas *Tbr1+* en los embriones *Dyrk1a^{+/-}* en estos estadios del desarrollo (Najas y col., 2015).

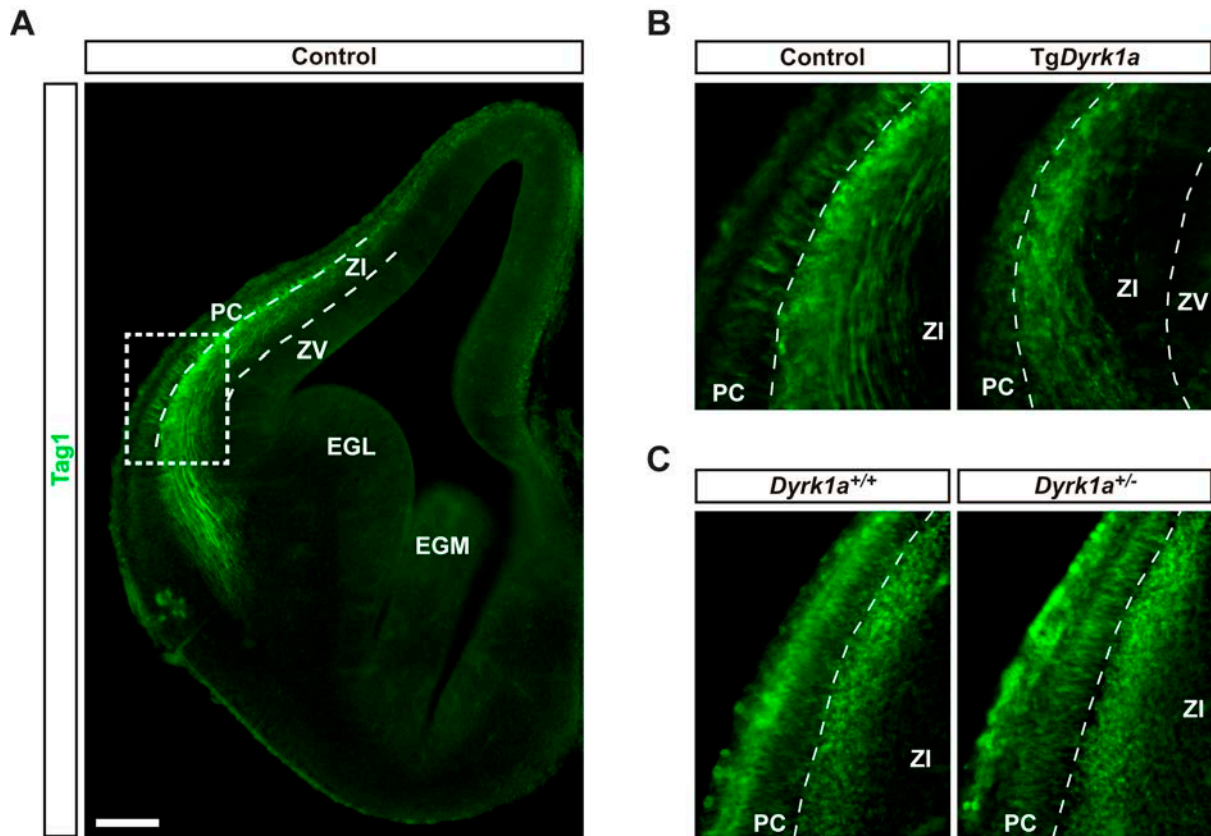


Figura 16. Expresión de la inmunorreactividad de TAG1 en el telencéfalo de embriones E13,5 mBACTg*Dyrk1a* (*TgDyrk1a*), *Dyrk1a*^{+/+} y sus respectivos controles de camada. (A) Imagen representativa del telencéfalo donde se observan fibras TAG1 inmunopositivas. (B, C) Ampliaciones del telencéfalo lateral a la altura de la región indicada con un rectángulo en A en las que se observan fibras TAG1+ en embriones control y *TgDyrk1a* (B) y en embriones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{-/-} (C). Las imágenes mostradas en B y C son representativas de los embriones examinados (controles *TgDyrk1a*, n = 5; *TgDyrk1a*, n = 3; *Dyrk1a*^{+/+}, n = 6; *Dyrk1a*^{-/-}, n = 4). Barra de escala en A: 50 μ m. PC: Placa cortical; ZI: Zona intermedia; ZV: Zona ventricular; EGL: Eminencia ganglionar lateral; EGM: Eminencia ganglionar medial.

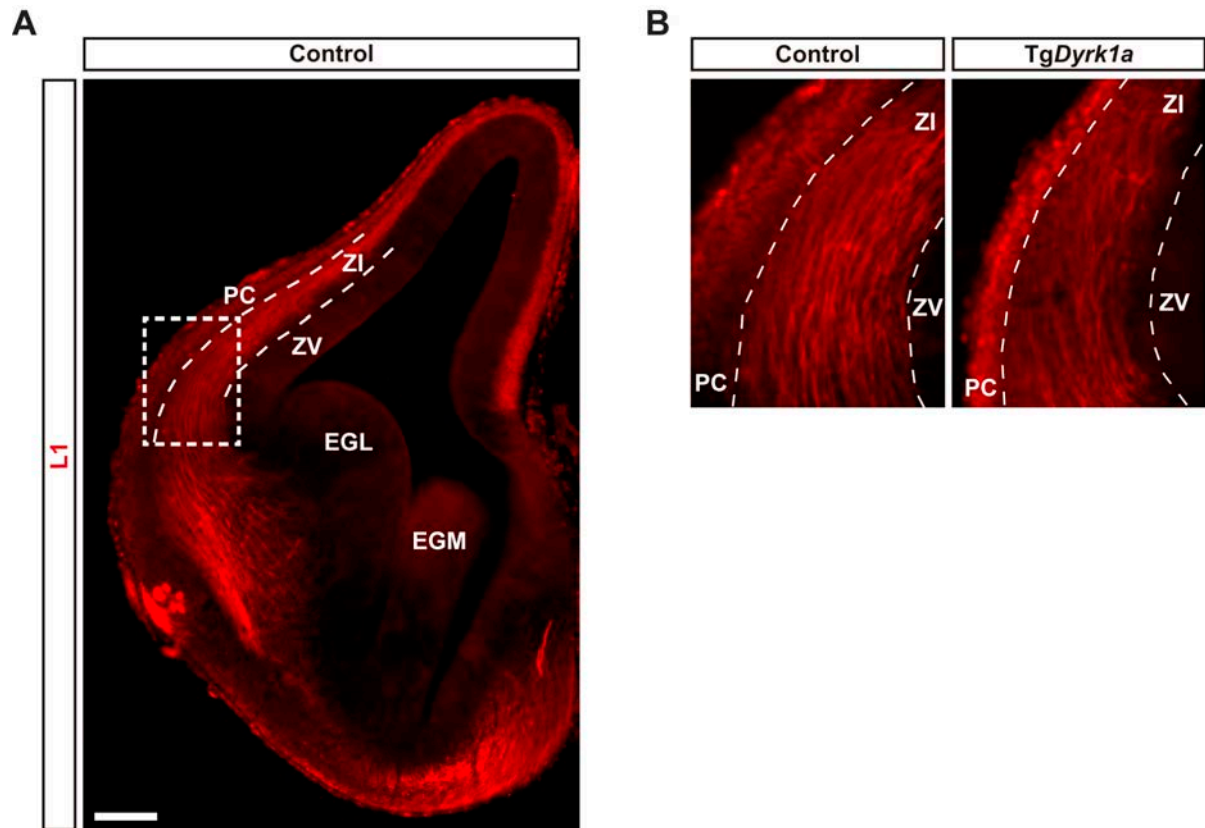


Figura 17. Expresión de la inmunorreactividad de L1 en el telencéfalo de embriones E13,5 mBACTgDyrk1a (TgDyrk1a) y controles de camada. (A) Imagen representativa de las vesículas telencefálicas donde se observan fibras L1 inmunopositivas. **(B)** Ampliaciones de la región delimitada con un rectángulo en A en las que se observan fibras L1+ en embriones de los dos genotipos. Las imágenes mostradas en B son representativas de los embriones examinados (controles, n = 5; TgDyrk1a, n = 3). Barra de escala en A: 50 μ m. PC: Placa cortical; ZI: Zona intermedia; ZV: Zona ventricular; EGL: Eminencia ganglionar lateral; EGM: Eminencia ganglionar medial.

2. Efecto de la variación de la dosis génica de *Dyrk1a* en la celularidad de la CSS en estadios postnatales

Como se ha comentado en el apartado de Introducción, trabajos previos indicaban que la densidad neuronal en la CSS de los ratones adultos está inversamente relacionada con la dosis génica de *Dyrk1a*; incrementada en los ratones *Dyrk1a*^{+/-} y reducida en los ratones mBACTg*Dyrk1a* (Fotaki y col., 2002; Guedj y col., 2012). Además, en los ratones mBACTg*Dyrk1a* de sobre-expresión de *Dyrk1a* se observaron alteraciones en la proporción de los subtipos mayoritarios de interneuronas corticales. Estos defectos en celularidad son debidos a alteraciones que acontecen durante el desarrollo embrionario en el *pallium* dorsal, donde se generan las neuronas de proyección (glutamatérgicas), y en el *subpallium*, donde se producen las interneuronas (GABAérgicas; Najas, 2014). Con el propósito de aportar más evidencias sobre el impacto de la haploinsuficiencia y la sobre-expresión de *Dyrk1a* en la generación de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas, en este trabajo hemos cuantificados estos dos tipos de neuronas en ratones *Dyrk1a*^{+/-}, mBACTg*Dyrk1a* y sus respectivos controles de camada en estadios postnatales.

2.1. Efecto de la pérdida de función de *Dyrk1a* en el número de neuronas glutamatérgicas

La CSS de ratones adultos *Dyrk1a*^{+/-} es ligeramente más fina que la de los controles de camada. Sin embargo, la densidad de neuronas en estos mutantes es significativamente mayor en todas las capas (Guedj y col., 2012; Najas, 2014). Este incremento de neuronas correlaciona con la mayor producción de neuronas observada al inicio de la neurogénesis en el *pallium* de embriones *Dyrk1a*^{+/-} (Najas y col., 2015). Para estimar la consecuencia de los defectos en la neurogénesis de este mutante *Dyrk1a*, se cuantificaron distintos subtipos de neuronas excitadoras en la CSS de ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} a P7, cuando la migración radial ha terminado y las neuronas excitadoras están en su posición definitiva (Miller, 1988). Para ello hemos realizado inmunofluorescencias y teñido los núcleos con DAPI para diferenciar las distintas capas de la neocorteza.

Inicialmente, se cuantificaron las neuronas inmunomarcadas con NeuN, un marcador general de neuronas, que marca todas las neuronas excitadoras y la mayoría de las interneuronas (Mullen y col., 1992). Las imágenes de inmunofluorescencia de secciones

coronales no mostraron diferencias relevantes entre genotipos en la laminación de la neocorteza (Fig. 18A). Sin embargo, el número de neuronas NeuN+ cuantificadas en la CSS

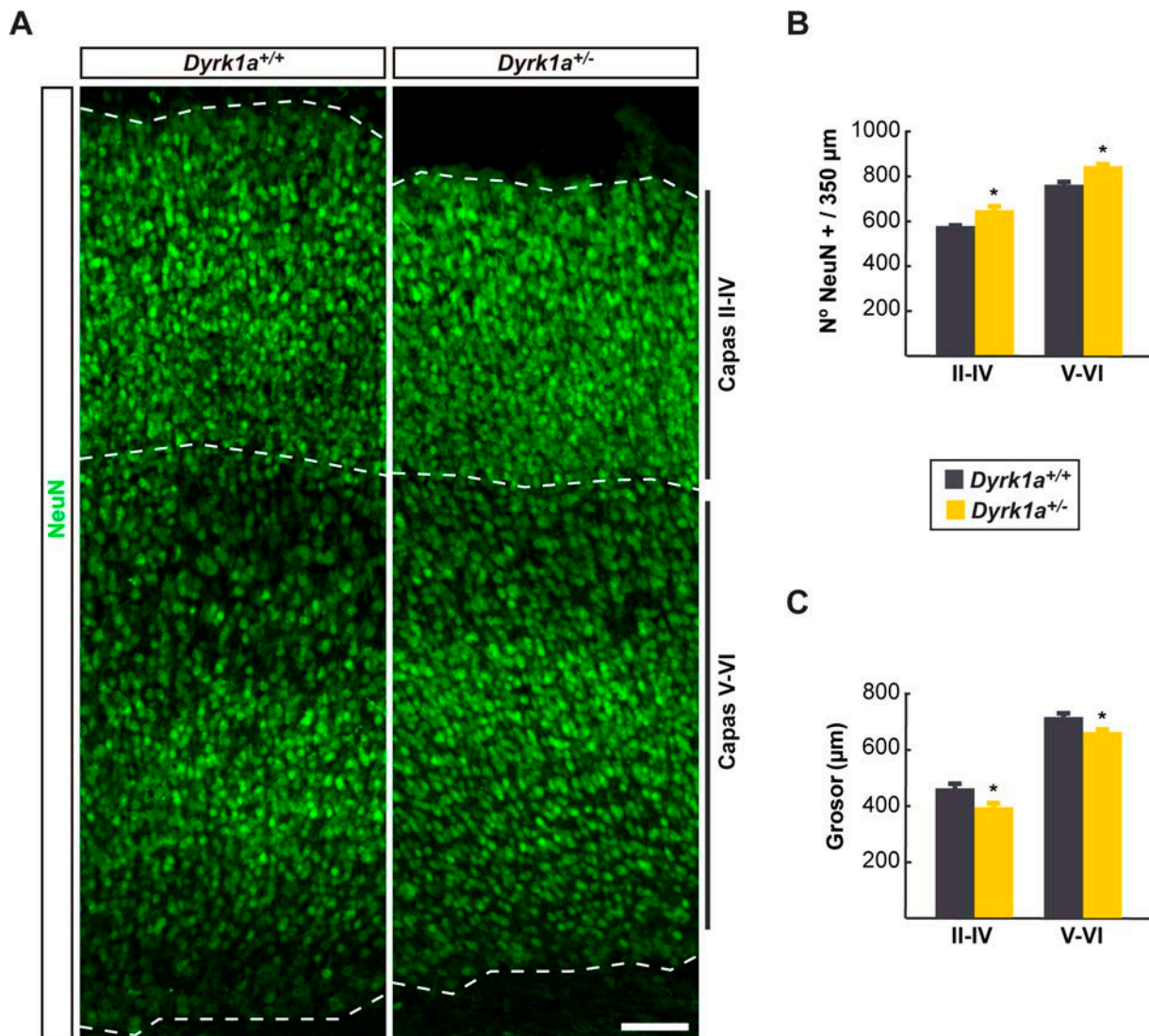


Figura 18. Número de neuronas NeuN inmunopositivas en las capas altas y bajas de la corteza somatosensorial (CSS) de ratones postnatales (P7) *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-}. **(A)** Imágenes representativas del inmunomarcaje con NeuN en la CSS de ratones de los genotipos indicados. **(B, C)** Los histogramas muestran el número de células NeuN+ en las capas altas (II-IV) y en las capas bajas (V-VI) de la CSS cuantificadas en una columna de 350 μm de ancho **(B)** y el grosor de estas capas **(C)**. Los valores corresponden a la media ± EEM. *p < 0,05 (*Dyrk1a*^{+/+}, n = 4; *Dyrk1a*^{+/-}, n = 5). Barra de escala en **A**: 50 μm.

fue significativamente superior en los animales *Dyrk1a*^{+/-} que en los controles *Dyrk1a*^{+/+}. Este incremento se observó tanto en las capas altas (capas II-IV, incremento alrededor del 15%, p = 0,029, prueba T de Student) como en las capas bajas (capas V-VI, incremento alrededor del 10%, p = 0,028, prueba T de Student; Fig. 18A, B). Además, observamos una disminución significativa en el grosor de las capas altas y bajas de la CSS de los ratones

Dyrk1a^{+/-} respecto a los controles ($p = 0,010$, prueba T de Student; Fig. 18A, C). Estos datos correlacionan con el incremento de neuronas observado en el telencéfalo dorso-lateral de embriones *Dyrk1a*^{+/-} al inicio de la corticogénesis, a E11,5 (Najas y col., 2015) y con la mayor densidad neuronal de la corteza de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} adultos descrita en trabajos anteriores (Guedj y col., 2012).

Inmunomarcajes realizados en el laboratorio con el marcador de capa VI Tbr1, habían mostrado un incremento de neuronas Tbr1+ en la capa VI de la CSS de animales P7 *Dyrk1a*^{+/-} respecto a los controles de camada (Najas y col., 2015) Para averiguar si este incremento de neuronas en los animales *Dyrk1a*^{+/-} es generalizado o tipo-específico, se realizaron inmunomarcajes en secciones del mismo grupo de animales *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} con anticuerpos frente a dos marcadores adicionales de capa: los factores de transcripción Ctip2 y Mef2c. Ctip2 se expresa de forma abundante en neuronas de la capa V de la corteza (Arlotta y col., 2005). Tal como se observa en la Fig. 19A, la mayoría de las neuronas que son claramente Ctip2+ se encuentran en la capa V de la CSS tanto en los animales *Dyrk1a*^{+/+} como en los *Dyrk1a*^{+/-}. Sin embargo, tanto el grosor de la capa V, definido con la tinción de DAPI ($p = 0,047$, prueba T de Student), como el número de neuronas Ctip2+ en esta capa son significativamente menores en los mutantes *Dyrk1a*^{+/-} que en los controles ($p = 0,001$, prueba T de Student; Fig. 19B, C). Las inmunotinciones con anticuerpos frente a Mef2c, un factor de transcripción que se expresa preferentemente en neuronas de proyección situadas en las capas altas (capas II, III y IV) del neocórtex (Leifer y col., 1993), tampoco revelaron diferencias en la distribución por capas de las neuronas Mef2c+ que se sitúan preferentemente en las capas II-IV, definidas con la tinción de DAPI, tanto en los ratones *Dyrk1a*^{+/+} como en los *Dyrk1a*^{+/-} (Fig. 20A). Sin embargo, el número de neuronas Mef2c+ en estas capas es significativamente distinto en los dos genotipos. En este caso, y al contrario de lo observado con las neuronas Ctip2+, los ratones *Dyrk1a*^{+/-} presentaban más neuronas Mef2c+ (aumento del 15%; $p = 0,001$, prueba T de Student) que los controles de camada (Fig. 20B). Al igual que ocurre con la capa V, el grosor de las capas II-IV en los mutantes *Dyrk1a*^{+/-} es significativamente menor que en los controles ($p < 0,001$, prueba T de Student; Fig. 20C).

Estos resultados en su conjunto indican que la haploinsuficiencia de *Dyrk1a* altera la proporción de los distintos subtipos de neuronas excitadoras que forman la circuitería cortical. Los cambios en el número de neuronas NeuN+, Ctip2+ y Mef2c+ en los ratones *Dyrk1a*^{+/-} son opuestos a los observados previamente en los ratones postnatales mBACTg*Dyrk1a* que sobre-expresan DYRK1A (Najas y col., 2015), indicando que la quinasa DYRK1A regula la corticogénesis de forma dosis dependiente.

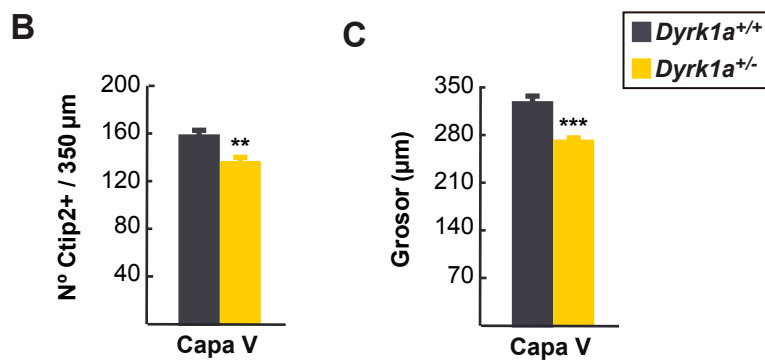
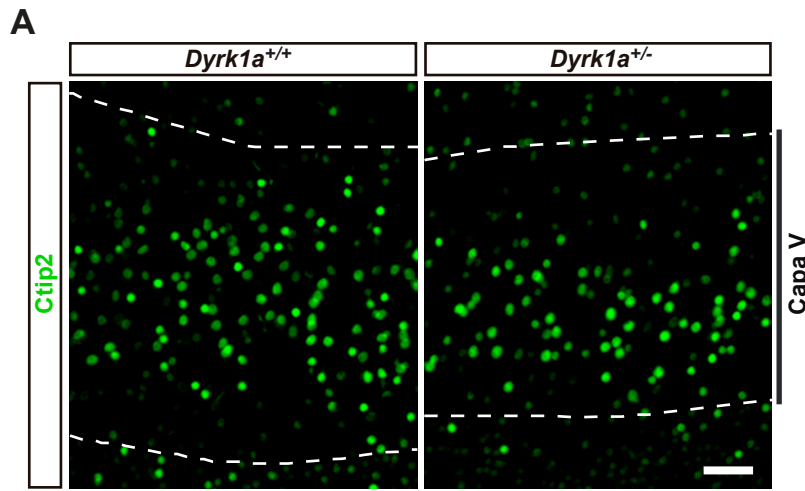


Figura 19. Número de neuronas Ctip2 inmunopositivas en la capa V de la corteza somatosensorial (CSS) de ratones postnatales (P7) *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-}. (A) Imágenes representativas del inmunomarcaje con Ctip2 en la CSS de ratones de los genotipos indicados. (B, C) Los histogramas muestran el número de células Ctip2+ en la capa V de la CSS cuantificadas en una columna de 350μm de ancho (B) y el grosor de esta capa (C). Los valores corresponden a la media ± EEM. **p < 0,01, ***p < 0,001 (*Dyrk1a*^{+/+}, n = 4; *Dyrk1a*^{+/-}, n = 5). Barra de escala en A: 50 μm.

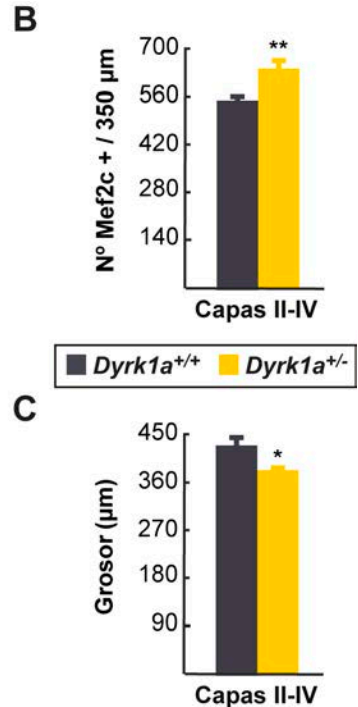
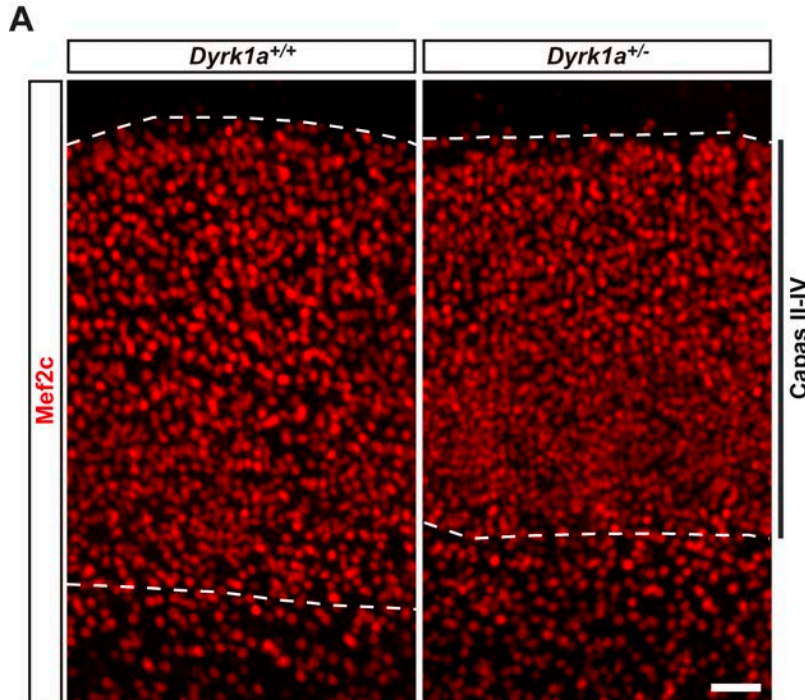


Figura 20. Número de neuronas Mef2c inmunopositivas en las capas II-IV de la corteza somatosensorial (CSS) de ratones postnatales (P7) *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-}. (A) Imágenes representativas del inmunomarcaje con Ctip2 en las capas altas de la CSS de ratones de los genotipos indicados. (B, C) Los histogramas muestran el número de células Mef2c+ en las capas II-IV de la CSS cuantificadas en una columna de 350 μm de ancho (B) y el grosor de estas capas (C). Los valores corresponden a la media ± EEM. *p < 0,05, **p < 0,01 (*Dyrk1a*^{+/+}, n = 4; *Dyrk1a*^{+/-}, n = 5). Barra de escala en A: 50 μm.

2.2. Efecto de la pérdida y ganancia de función de *Dyrk1a* en el número de neuronas GABAérgicas

Como se ha descrito en la Introducción (capítulo 1.1) las poblaciones de neuronas GABAérgicas (interneuronas) comprenden entre un 20 y un 30% de las neuronas que componen la corteza cerebral (Sultan y col., 2013) y, se clasifican en distintos subtipos según sus características morfológicas, sinápticas o la expresión de marcadores proteicos (Markram y col., 2004; Sultan y col., 2013; Tremblay y col., 2016). El 90% de las neuronas GABAérgicas de la corteza se pueden inmunomarcarse con anticuerpos frente a PV, CR o SST (Gonchar y col., 2008).

Resultados del laboratorio han revelado diferencias significativas en el número de neuronas GABAérgicas PV+ y SST+ en la CSS del ratón mBACTg*Dyrk1a* adulto que parecen ser debidas a alteraciones que acontecen durante el desarrollo embrionario (Najas, 2014). Para aportar más evidencias sobre el efecto de la sobre-expresión de DYRK1A en la generación de interneuronas, se realizaron experimentos de inmunohistoquímica para cuantificar las neuronas que expresan los marcadores PV, SST o CR en la CSS de ratones mBACTg*Dyrk1a* y controles de camada a P14, después de la migración tangencial y muerte fisiológica en estos tipos de interneuronas, y cuando la expresión de estos marcadores se expresan en las poblaciones de interneuronas corticales (Mukhopadhyay y col., 2009). La distribución por capas (capas altas; II-IV y capas bajas; V-VI) de estas tres poblaciones de interneuronas en los ratones control (Fig. 21A-F) está de acuerdo con datos obtenidos del análisis de ratones P16 (Gonchar y col., 2008), en los que se observó una localización preferente de las neuronas SST+ en las capas bajas de la corteza y de las neuronas CR+ en las capas altas, mientras que las neuronas PV+ se distribuyen casi por igual en capas altas y bajas. La distribución por capas de estas tres poblaciones de interneuronas en los ratones mBACTg*Dyrk1a* es semejante a los controles (Fig. 21D-F). Sin embargo, los ratones transgénicos tienen menos neuronas PV+, tanto en las capas altas ($p = 0,026$, prueba T de Student) como en las bajas ($p = 0,034$, prueba T de Student), y más neuronas SST+ ($p = 0,013$, prueba T de Student) y neuronas CR+ ($p = 0,025$, prueba T de Student) en las capas bajas de la CSS (Fig. 21D-F). Alteraciones en el número de neuronas SST+ y neuronas PV+ en el mismo sentido (aumento de SST+ y disminución de PV+) se han observado también en ratones mBACTg*Dyrk1a* adultos (Najas, 2014).

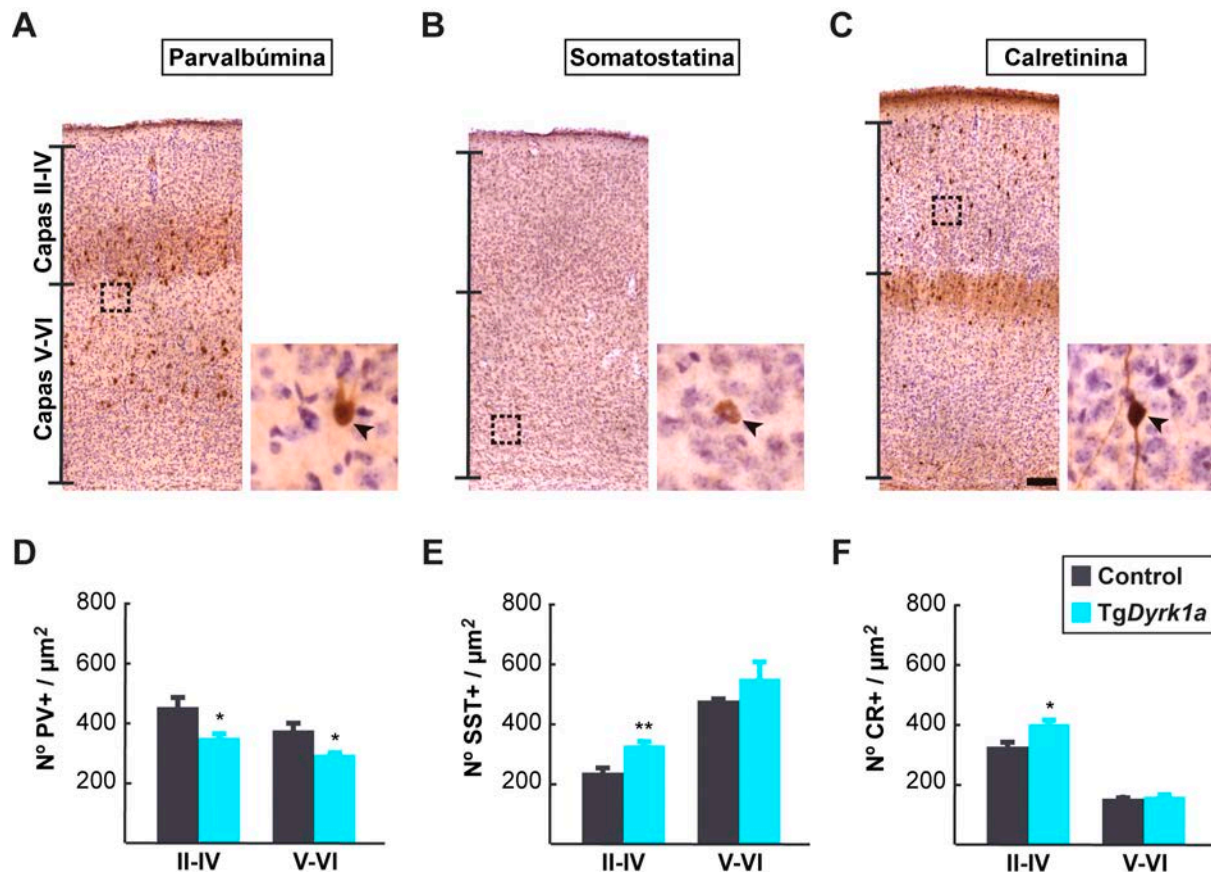


Figura 21. Número de interneuronas en la corteza somatosensorial (CSS) de ratones postnatales (P14) mBACTgDyrk1a (TgDyrk1a) y controles de camada. (A-C) Imágenes representativas de secciones de la CSS de ratones control inmunomarcadas con parvalbúmina (PV) (A), somatostatina (SST) (B) o calretinina (CR) (C) y contrateñidas con Nissl. Los cuadrados indican la región ampliada en las imágenes de la derecha. Las puntas de flecha indican neuronas inmunopositivas. (D-F) Los histogramas muestran la densidad de interneuronas PV+ (D), SST+ (E) y CR+ (F) en las capas altas (capas II-IV) y bajas (capas V-VI) de la CSS de ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-}. Los valores de los histogramas corresponden a la media \pm EEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (controles, $n = 4$; TgDyrk1a, $n = 3$). Barra de escala en C: 100 μm .

A continuación y con el propósito de aportar alguna evidencia sobre un posible efecto de la haploinsuficiencia de *Dyrk1a* en la generación de neuronas GABAérgicas corticales, se realizó un estudio de inmunohistoquímica igual al anterior en un grupo de ratones P14 *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-}. En este caso tampoco se observaron diferencias significativas entre genotipos en la distribución de interneuronas PV+, SST+ y CR+ en las capas altas y bajas de la CSS (Fig. 22A-F). Las cuantificaciones de estas tres poblaciones de interneuronas revelaron diferencias significativas únicamente en la población CR+ en las capas altas de la corteza (Fig. 22D-F). En los mutantes *Dyrk1a*^{+/-}, al contrario de lo que ocurre en los mBACTgDyrk1a (ver Fig. 21F), el número de interneuronas CR+ es menor que en los controles ($p = 0,006$, prueba T de Student ; Fig. 22F). Este resultado indica que cambios en la dosis génica de *Dyrk1a* afecta la generación de las interneuronas corticales.

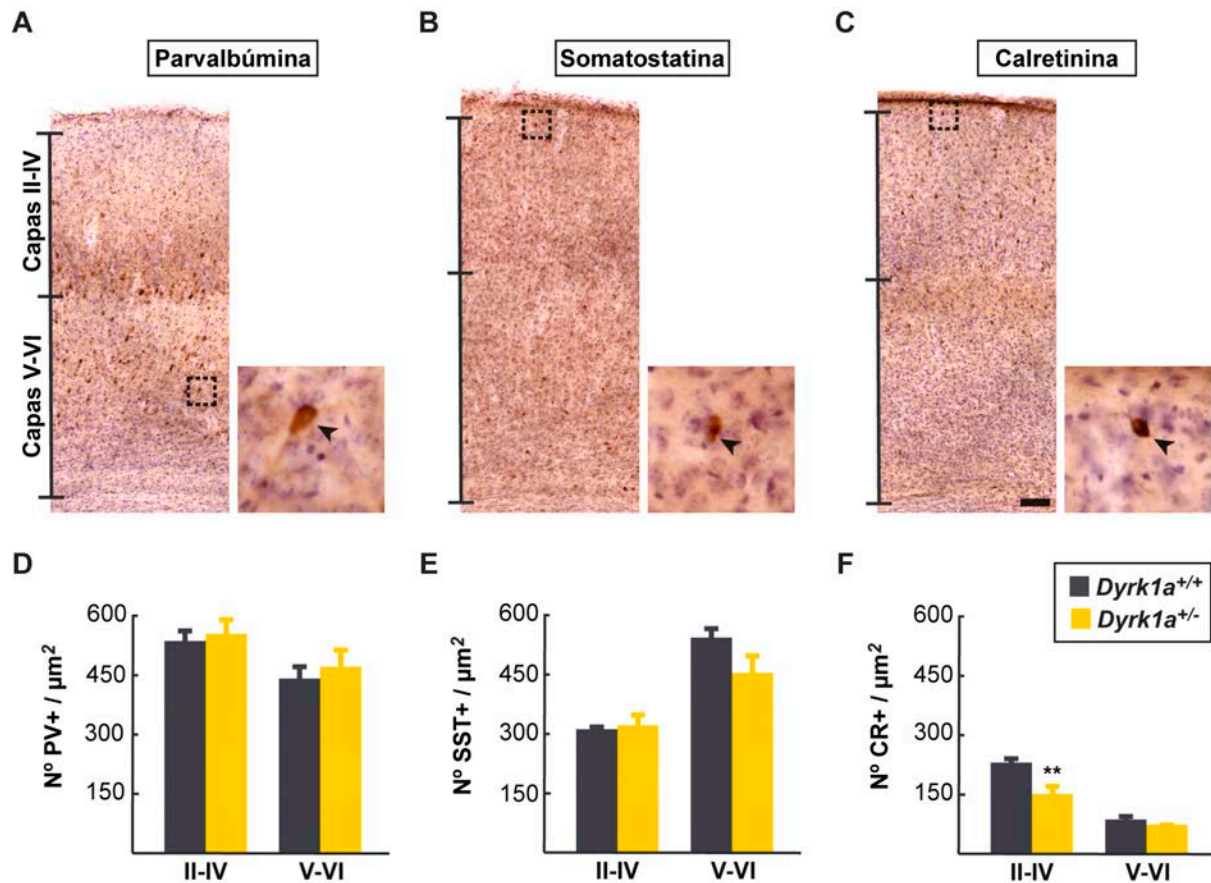


Figura 22. Número de interneuronas en la corteza somatosensorial (CSS) de ratones postnatales (P14) *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-}. (A-C) Imágenes representativas de secciones de la CSS de ratones *Dyrk1a*^{+/+} inmunomarcadas con parvalbúmina (PV) (A), somatostatina (SST) (B) o calretinina (CR) (C) y contrateñidas con Nissl. Los cuadrados indican la región ampliada en las imágenes de la derecha. Las puntas de flecha indican neuronas inmunopositivas. (D-F) Los histogramas muestran la densidad de interneuronas PV+ (D), SST+ (E) y CR+ (F) en las capas altas (capas II-IV) y bajas (capas V-VI) la CSS de ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-}. Los valores de los histogramas corresponden a la media ± EEM. **p < 0,01 (*Dyrk1a*^{+/+}, n = 9; *Dyrk1a*^{+/-}, n = 7). Barra de escala en C: 100 μm.

En resumen, los resultados de las cuantificaciones de neuronas corticales excitadoras e inhibitoras presentados en este trabajo junto a los descritos en Najas y colaboradores (2015), ponen de manifiesto alteraciones importantes en el balance de neuronas corticales excitadoras e inhibitoras durante el desarrollo postnatal de los ratones mutantes de pérdida y ganancia de función de DYRK1A que pueden tener consecuencias en la conectividad sináptica (función cerebral) del cerebro adultos.

3. Efecto de la variación de la dosis génica de *Dyrk1a* en la proporción de neuronas excitadoras e inhibitoras

El recuento de núcleos en secciones teñidas con violeta de cresilo sugerían que la densidad neuronal en la CSS de ratones *Dyrk1a*^{+/-} es mayor que en los ratones controles de camada (Fotaki y col., 2002). Esta observación inicial fue confirmada años más tarde utilizando el marcador general de neuronas NeuN (Guedj y col., 2012). En este mismo trabajo se mostraba además que los ratones mBACTg*Dyrk1a* adultos tienen una menor densidad de neuronas en la neocorteza. Tal como ya hemos mencionado, se había observado también que los ratones de sobre-expresión mBACTg*Dyrk1a* tienen una proporción alterada de interneuronas PV+ y SST+ (Najas, 2014). Dado que el marcador NeuN se expresa en todas las neuronas excitadoras y en parte de las interneuronas (Mullen y col., 1992), estos estudios previos no permitieron estimar la densidad de neuronas excitadoras ni la densidad de interneuronas.

En este trabajo hemos realizado dobles inmunofluorescencias con los marcadores neuronales NeuN y GABA (marca todas las interneuronas) para estimar la densidad de neuronas excitadoras (células NeuN+/GABA-) e inhibitoras (células GABA+; Bartolini y col., 2013; Gelman y Marin, 2010) en la CSS de ratones adultos *Dyrk1a*^{+/-}, mBACTg*Dyrk1a* y controles de camada de 2 meses de edad. Para diferenciar las distintas capas de la CSS, los núcleos se tiñeron con DAPI.

La disposición por capas de las neuronas NeuN+ en la CSS de los ratones mBACTg*Dyrk1a* adultos es muy similar a la de los controles de camada. Sin embargo, al cuantificar el grosor de las capas más externas (capas II-IV) y más profundas (capas V-VI) de la corteza, se observó un ligero incremento, aunque significativo, en las capas profundas de los ratones mBACTg*Dyrk1a* ($p = 0,019$, prueba T de Student; Fig. 23A). El recuento de neuronas NeuN+ en las secciones revelaron una disminución significativa, de alrededor del 15%, en las capas externas ($p = 0,040$, prueba T de Student) e internas ($p = 0,049$, prueba T de Student) de la CSS en los ratones que sobre-expresan *Dyrk1a* respecto a los controles (Fig. 23B, C). Este dato está de acuerdo con lo publicado previamente por Guedj y colaboradores (2012) en animales mBACTg*Dyrk1a* de 3-4 meses de edad. Posteriormente, se cuantificaron las neuronas que expresaron el marcador neuronal GABA en las mismas secciones. En este caso, no se observaron diferencias significativas entre genotipos ($p = 0,017$, prueba T de Student; Fig. 23B, D). Por último, el número de neuronas excitadoras (NeuN+ GABA-) estimado resultó ser significativamente inferior en las capas altas (disminución cercana al 15%, $p = 0,044$, prueba T de Student) de la CSS de los ratones

mBACTg*Dyrk1a* en comparación con los ratones control de camada, pero no en las capas más profundas ($p = 0,137$, prueba T de Student; Fig. 23B, E).

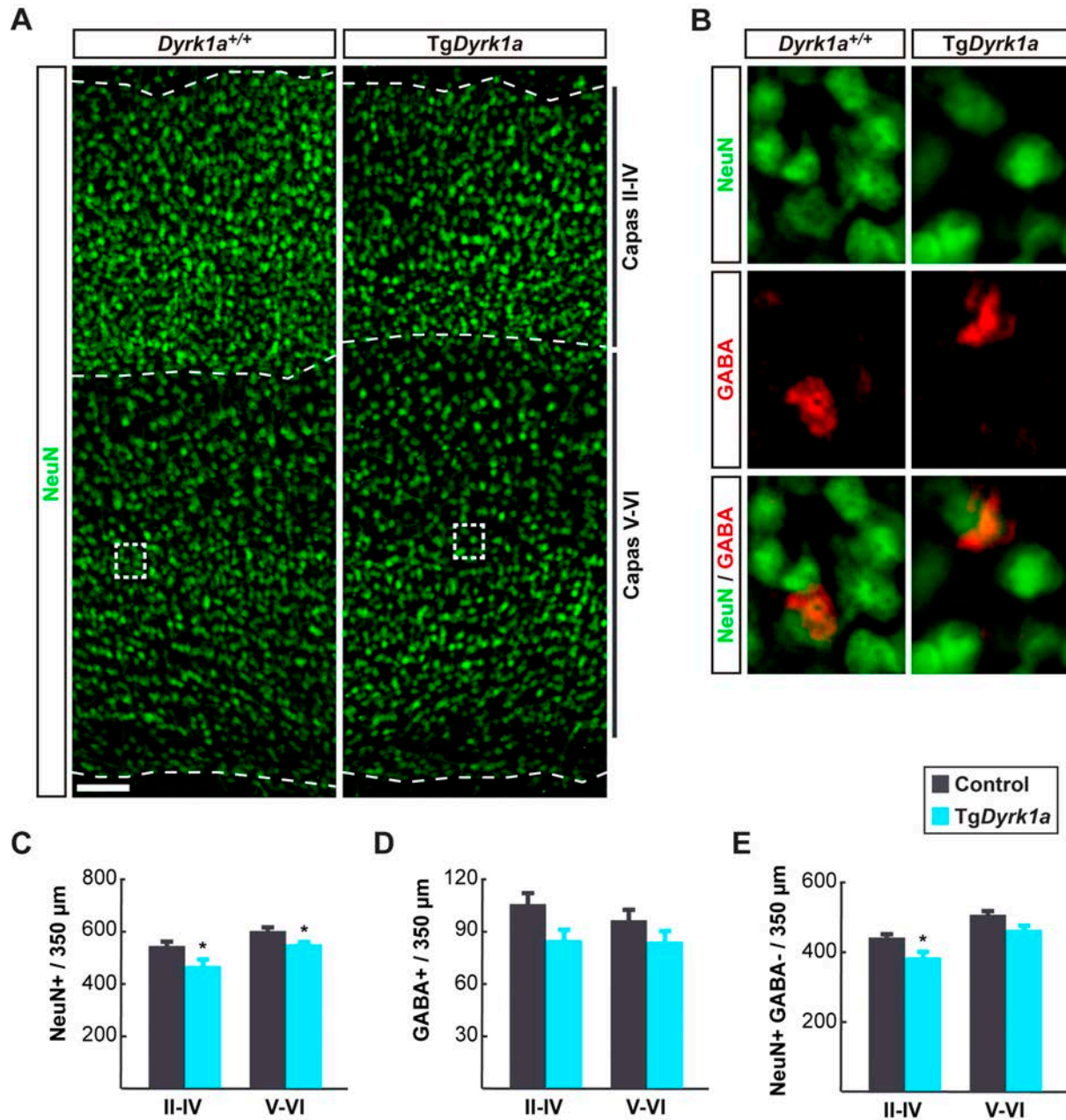


Figura 23. Número de neuronas NeuN y GABA inmunopositivas en las capas de la corteza somatosensorial (CSS) de ratones adultos mBACTg*Dyrk1a* (*TgDyrk1a*) y controles de camada. (A) Imágenes representativas del inmunomarcaje con NeuN en las capas altas (capas II-VI) y en las capas bajas (V-VI) de la CSS de ratones de 2 meses de edad de los genotipos indicados. (B) Las imágenes son ampliaciones de las regiones delimitadas por un rectángulo en A y muestran el marcaje de NeuN, GABA y NeuN + GABA. (C-E) Los histogramas muestran el número de neuronas NeuN+ (C), GABA+ (inhibidoras) (D) y NeuN+ GABA- (excitadoras) (E) en las capas II-IV y V-VI en una columna de la CSS de 350 μm de ancho. Los valores corresponden a la media ± EEM. * $p < 0,05$ ($n = 4$ animales por genotipo). Barra de escala en A: 100 μm.

Al igual que los ratones mBACTg*Dyrk1a*, los ratones *Dyrk1a*^{+/-} presentan una laminación semejante a la de los controles, pero al contrario que éstos, los ratones *Dyrk1a*^{+/-} tienen una corteza ligeramente más fina que los controles de camada ($p = 0,006$, prueba T de Student; Fig. 24A). Este dato está de acuerdo con las medidas realizadas previamente en secciones de animales postnatales *Dyrk1a*^{+/-} (ver Resultados, apartado 2.1) y animales adultos (Fotaki y col., 2002; Guedj y col., 2012). El recuento de neuronas que expresaban el marcador NeuN en secciones de animales *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} reveló un aumento de neuronas del 10% en los ratones mutantes tanto en las capas externas ($p = 0,044$, prueba T de Student) como internas ($p = 0,019$, prueba T de Student) de la neocorteza (Fig. 24B, C). Este resultado correlaciona con lo publicado por Guedj y colaboradores (2012) donde se describe un incremento de la densidad de neuronas NeuN+ en la CSS de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} de 3-4 meses de edad. En el recuento de neuronas que expresaron el marcador neuronal GABA no se observaron diferencias significativas entre genotipos en las capas II-IV de la neocorteza ($p = 0,481$, prueba T de Student). Sin embargo, los ratones *Dyrk1a*^{+/-} mostraron un aumento del 25% de neuronas GABA+ en las capas bajas (capas V-VI) de la CSS ($p = 0,003$, prueba T de Student; Fig. 24B, D). Por último, el número de neuronas excitadoras (NeuN+ GABA-) estimado en la CSS de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} es superior (alrededor del 10%, $p = 0,041$, prueba T de Student) que en los ratones controles (Fig. 24B, E).

Los resultados presentados sobre las cuantificaciones de las neuronas excitadoras e inhibitoras corticales en este trabajo, conjuntamente con los descritos por Fotaki y colaboradores (2002), Guedj y colaboradores (2012) y Najas (2014), sugieren que los ratones que sobre-expresan DYRK1A tienen menos neuronas excitadoras en todas las capas de la neocorteza que los controles y un desequilibrio entre neuronas excitadoras/inhedoras, especialmente en las capas II-IV, que podría dar lugar a un exceso de inhibición. Por el contrario, los ratones de pérdida de función de *Dyrk1a* presentan un exceso de neuronas corticales excitadoras y un desequilibrio de la relación de neuronas excitadoras/inhedoras tanto en las capas externas como internas de la neocorteza, pudiendo dar lugar a una sobre-excitación de los circuitos corticales.

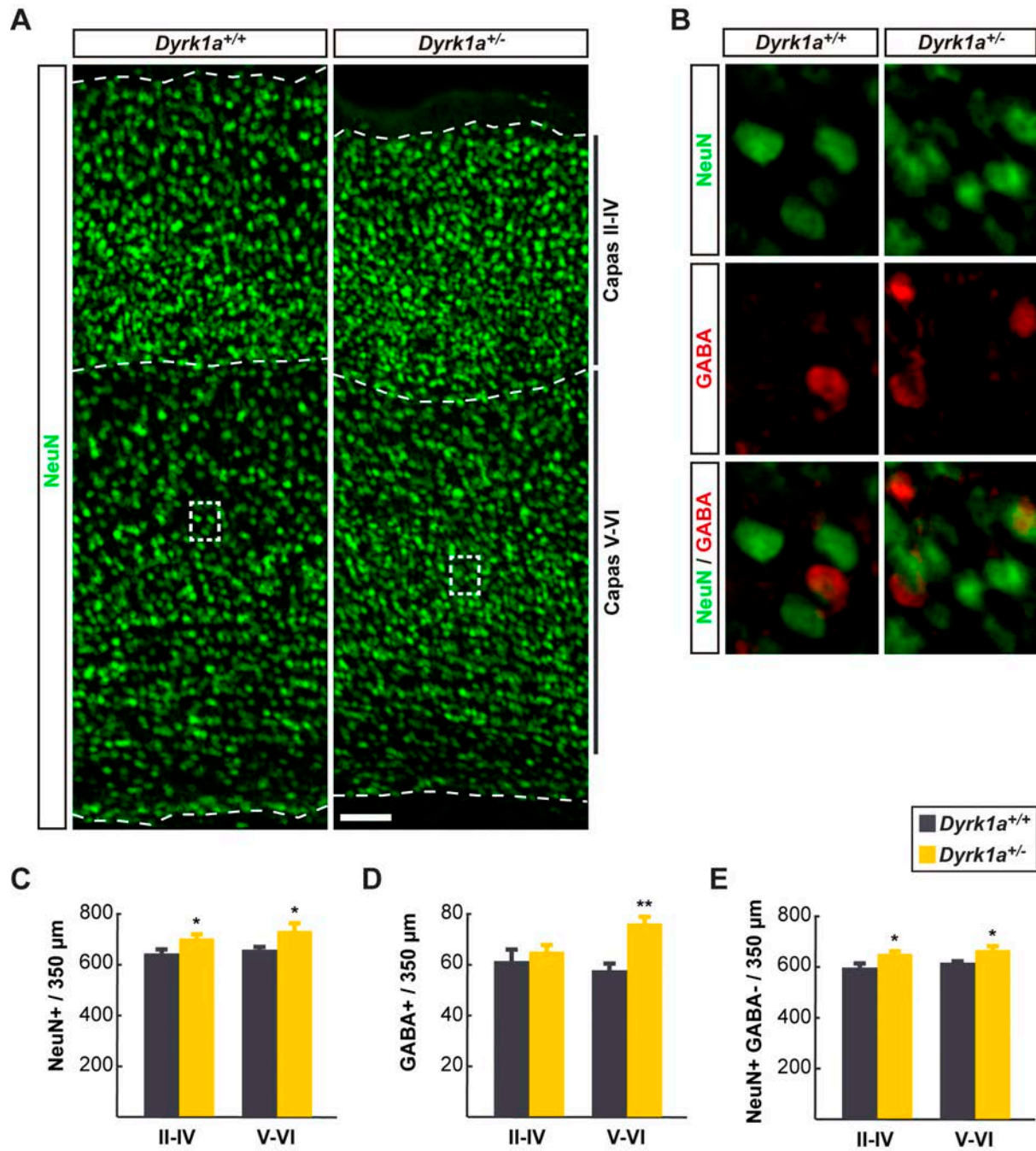


Figura 24. Número de neuronas NeuN y GABA inmunopositivas en las capas de la corteza somatosensorial (CSS) de ratones adultos *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-}. (A) Imágenes representativas del inmunomarcaje con NeuN en las capas altas (capas II-VI) y en las capas bajas (V-VI) de la CSS de ratones de 2 meses de edad de los genotipos indicados. (B) Las imágenes son ampliaciones de las regiones delimitadas por un rectángulo en A y muestra el marcate de NeuN, GABA y NeuN + GABA.. (C-E) Los histogramas muestran el número de neuronas NeuN+ (C), GABA+ (inhibidoras) (D) y NeuN+ GABA- (excitadoras) (E) en las capas II-IV y V-VI en una columna de la CSS de 350 μm de ancho. Los valores corresponden a la media ± EEM. *p < 0,05 (n = 4 animales por genotipo). Barra de escala en A: 100 μm.

4. Efecto de la pérdida de función de *Dyrk1a* en el número de subtipos de neuronas GABAérgicas en la corteza adulta

Las poblaciones de interneuronas en su conjunto representan el 20-30% de las neuronas de la neocorteza (Sultan y col., 2013) y el 10% de las del hipocampo (Babb y col., 1988). Con la utilización de los marcadores PV, SST, CR, NPY y VIP se puede visualizar casi el 90 % de las interneuronas corticales (Gonchar y col., 2008).

Para estimar el efecto de la haploinsuficiencia de *Dyrk1a* en el número de neuronas GABAérgicas, en este trabajo hemos cuantificado las principales subpoblaciones de interneuronas (PV+, SST+, CR+, NPY+ y VIP+) en la CSS y el hipocampo de ratones *Dyrk1a*^{+/-} y *Dyrk1a*^{+/+} de dos meses de edad.

4.1. Corteza somatosensorial

En el apartado anterior hemos mostrado que la neocorteza de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} adultos tienen más interneuronas (neuronas GABA+) que los controles (Fig. 24D). Con el fin de definir la/s poblaciones de interneuronas que contribuyen a este incremento, realizamos experimentos de inmunohistoquímica para cuantificar las interneuronas que expresan los marcadores PV, SST, CR, NPY y VIP en la CSS de ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} de dos meses de edad (Fig. 25A-E). Tras la realización de las inmunohistoquímicas, las secciones se contratiñeron con Nissl para diferenciar las seis capas de la corteza. Las cinco poblaciones de interneuronas analizadas están presentes tanto en las capas altas (II-IV) como en las capas bajas (V-VI) de la CSS de los ratones controles *Dyrk1a*^{+/+} (Fig. 25A-E). En concordancia con los datos publicados por Sultan y colaboradores (2013), la población de interneuronas más abundante en la CSS de estos ratones es la que expresa el marcador PV. Las cuantificaciones realizadas de las interneuronas PV+, SST+, CR+, NPY+ y VIP+ en las capas altas y bajas de la CSS de los ratones mutantes *Dyrk1a*^{+/-} no revelaron diferencias significativas entre genotipos (Fig. 25F). Estos resultados sugieren que el incremento de neuronas GABA+ detectado mediante inmunofluorescencia en las capas bajas de los mutantes *Dyrk1a* (ver Fig. 24D) podría deberse a la suma de pequeños cambios no significativos en las subpoblaciones analizadas o, alternativamente, a un incremento de poblaciones minoritarias de interneuronas corticales que no se detectan con los anticuerpos utilizados.

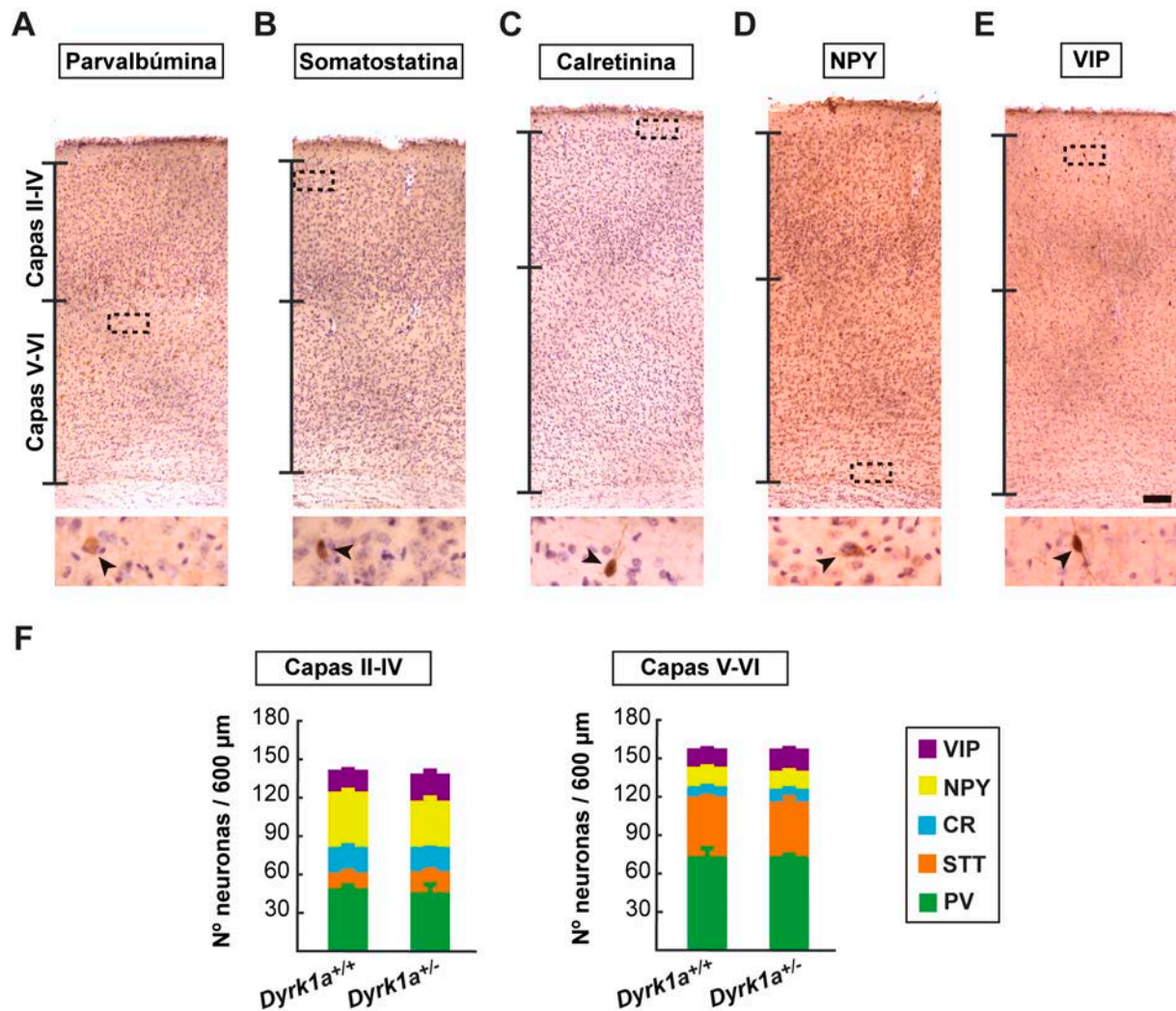


Figura 25. Número de interneuronas en la corteza somatosensorial (CSS) de ratones adultos *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-}. (A-E) Imágenes representativas de secciones de la CSS de ratones *Dyrk1a*^{+/+} de dos meses de edad inmunomarcadas con: (A) parvalbúmina (PV), (B) somatostatina (STT), (C) calretinina (CR), (D) neuropéptido Y (NPY) y (E) péptido intestinal vasoactivo (VIP) y contrateñidas con Nissl. Las imágenes en la parte inferior corresponden a ampliaciones de la región indicada por un rectángulo. Las puntas de flecha indican neuronas inmunopositivas. (F) Los histogramas muestran el número de las distintas poblaciones de interneuronas inmunomarcadas en las capas altas (capas II-IV) y en las bajas (capas V-VI) en una columna de 600 μm de ancho de la CSS de ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-}. Los valores corresponden a las medias ± E.E.M. n ≥ 3 animales por genotipo. En ninguno de los casos las diferencias entre genotipos fueron estadísticamente significativas (p > 0,05). Barra de escala en E: 100 μm.

4.2. Hipocampo

Hemos detectado una disminución del área de las tres regiones del hipocampo (CA1, CA3 y GD) en los ratones *Dyrk1a*^{+/-} con respecto a los controles. De hecho, estudios realizados en secciones teñidas con violeta de cresilo han descrito una disminución significativa tanto en el volumen como en la celularidad de las regiones CA1, CA3 y GD en

animales *Dyrk1a*^{+/-} envejecidos (Arqué y col., 2009). Para estudiar el efecto de la haploinsuficiencia de *Dyrk1a* en las subpoblaciones de interneuronas en el hipocampo, se realizaron las inmunohistoquímicas descritas en el apartado anterior en secciones de hipocampo de los mismos ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} que los utilizados para contar interneuronas en la CSS (Figs. 26-30). Las cuantificaciones de las neuronas inhibitoras PV+, SST+, CR+, NPY+ y VIP+ en las regiones CA1, CA2, CA3 y GD (definidas mediante una contratinción con Nissl) revelaron alteraciones significativas entre genotipos en el número de todas las poblaciones de interneuronas analizadas al menos en una de las áreas del hipocampo. Así por ejemplo, el recuento de interneuronas PV+ (Fig. 26A, B) mostró un incremento de más del 40% en la región CA3 del hipocampo de los ratones haploinsuficientes en comparación a los ratones control ($p = 0,010$, prueba T de Student; Fig. 26C). También se observó un incremento semejante de interneuronas SST+ (Fig. 27A, B) en la región CA1 del hipocampo de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} en comparación a los ratones *Dyrk1a*^{+/+} ($p = 0,003$, prueba T de Student; Fig. 27C). En el caso de las interneuronas CR+ (Fig. 28A, B), en los ratones *Dyrk1a*^{+/-} se observó una disminución significativa del 40% en la región CA1 del hipocampo ($p = 0,007$, prueba T de Student) y un aumento del 60% en el GD ($p = 0,011$, prueba T de Student; Fig. 28C). Por último, se observó una disminución del 25% de interneuronas NPY+ ($p = 0,015$, prueba T de Student; Fig. 29A-C) y un incremento del 50% de interneuronas VIP+ ($p = 0,040$, prueba T de Student; Fig. 30A-C) en el GD de los ratones de pérdida de función de *Dyrk1a* en comparación a los controles. Estos resultados, junto con los publicados anteriormente por Arqué y colaboradores (2009), muestran alteraciones importantes en la celularidad del hipocampo de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} adultos que podrían contribuir a cambios en la excitabilidad de los circuitos corticales.

En resumen, los resultados de las cuantificaciones de las subpoblaciones de interneuronas realizadas en este trabajo sugieren que las alteraciones en el número de interneuronas en los ratones *Dyrk1a*^{+/-} son región específicas y afectan principalmente al hipocampo.

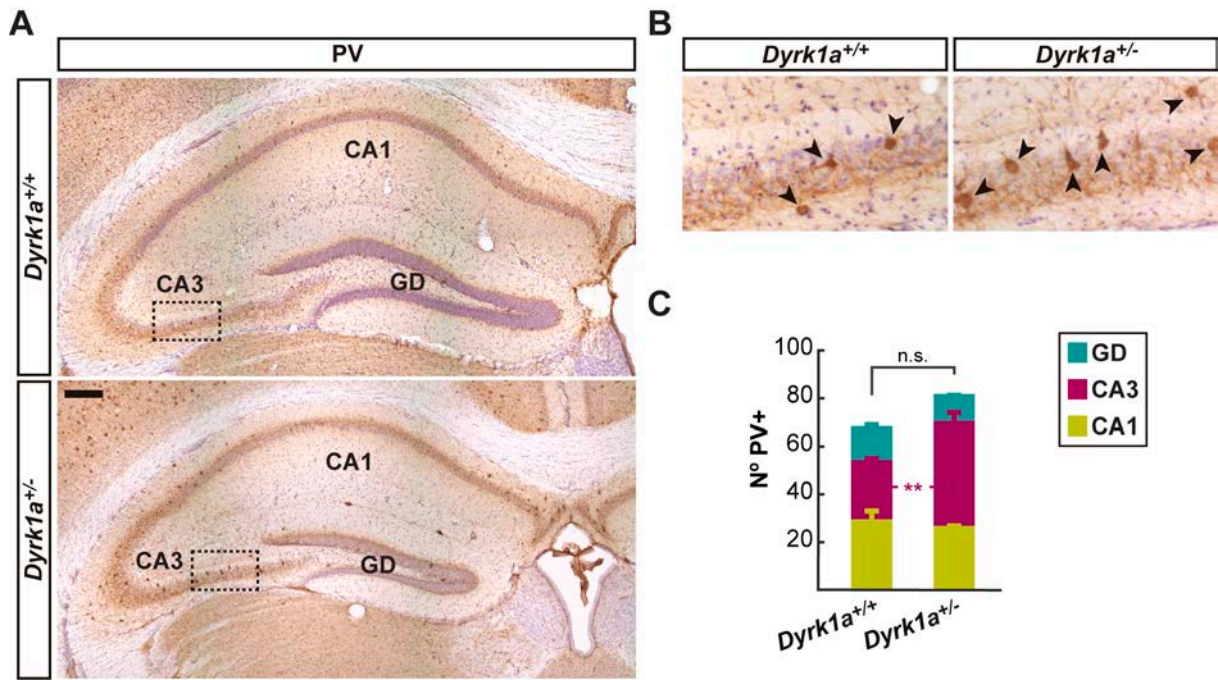


Figura 26. Número de interneuronas que expresan Parvalbúmina en el hipocampo de ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} adultos. (A) Imágenes representativas de secciones del hipocampo de ratones de 2 meses de edad de ambos genotipos inmunomarcadas con Parvalbúmina (PV) y contrateñidas con Nissl. Las cuantificaciones se han realizado en las áreas: CA1, CA3 y giro dentado (GD). (B) Ampliaciones de la región de la CA3 marcada con un rectángulo en A donde se ven varias interneuronas PV+ (puntas de flecha). (C) Histograma mostrando el número de interneuronas PV+ en la CA1, CA3 y giro dentado (GD) del hipocampo de ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-}. Los valores corresponden a la media ± E.E.M. (n = 3 animales por genotipo). Las diferencias entre genotipos fueron significativas (**p < 0,01) únicamente en la región CA3. n.s.: no significativo. Barra de escala en A: 200 µm.

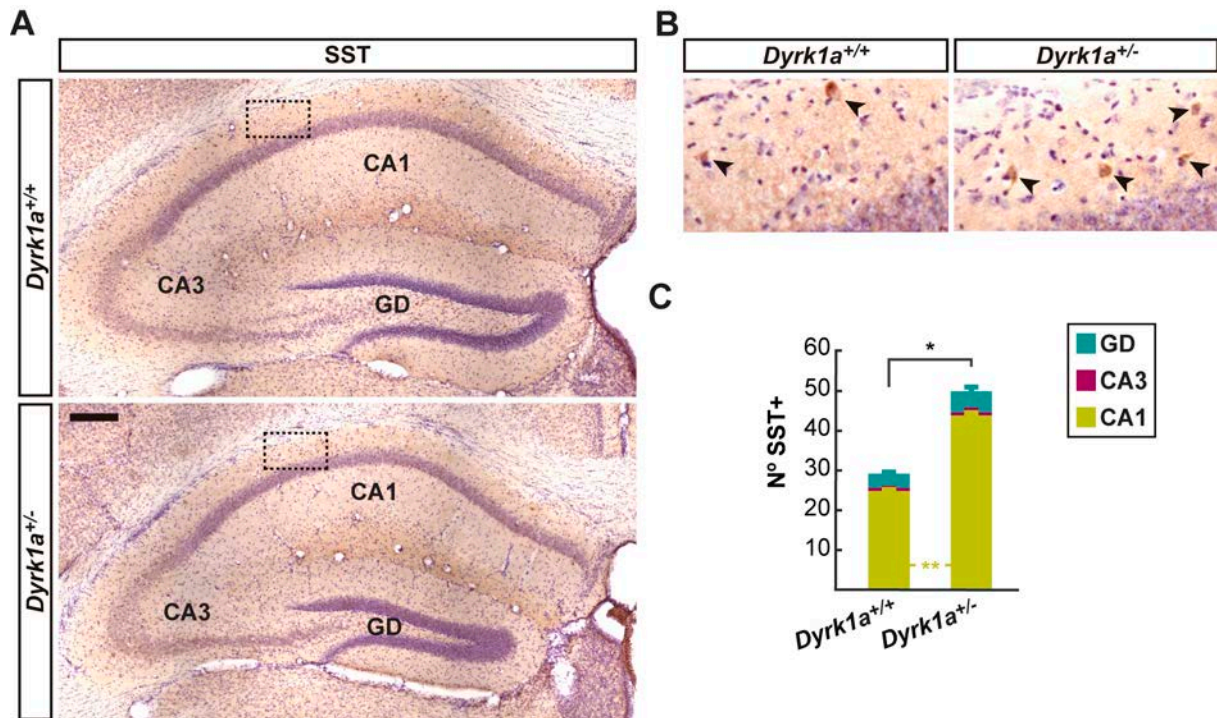


Figura 27. Número de interneuronas que expresan Somatostatina en el hipocampo de ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} adultos. (A) Imágenes representativas de secciones del hipocampo de ratones de 2 meses de edad de ambos genotipos inmunomarcadas con Somatostatina (SST) y contrateñidas con Nissl. (B) Ampliaciones de la región de la CA1 marcada con un rectángulo en A, donde se ven neuronas SST+ (puntas de flecha). (C) Histograma mostrando el número de interneuronas SST+ en la CA1, CA3 y giro dentado GD del hipocampo de ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-}. Los valores corresponden a la media \pm E.E.M. (n = 3 animales por genotipo). Las diferencias entre genotipos fueron significativas (**p < 0,01) únicamente en la región del GD. Barra de escala en A: 200 μ m.

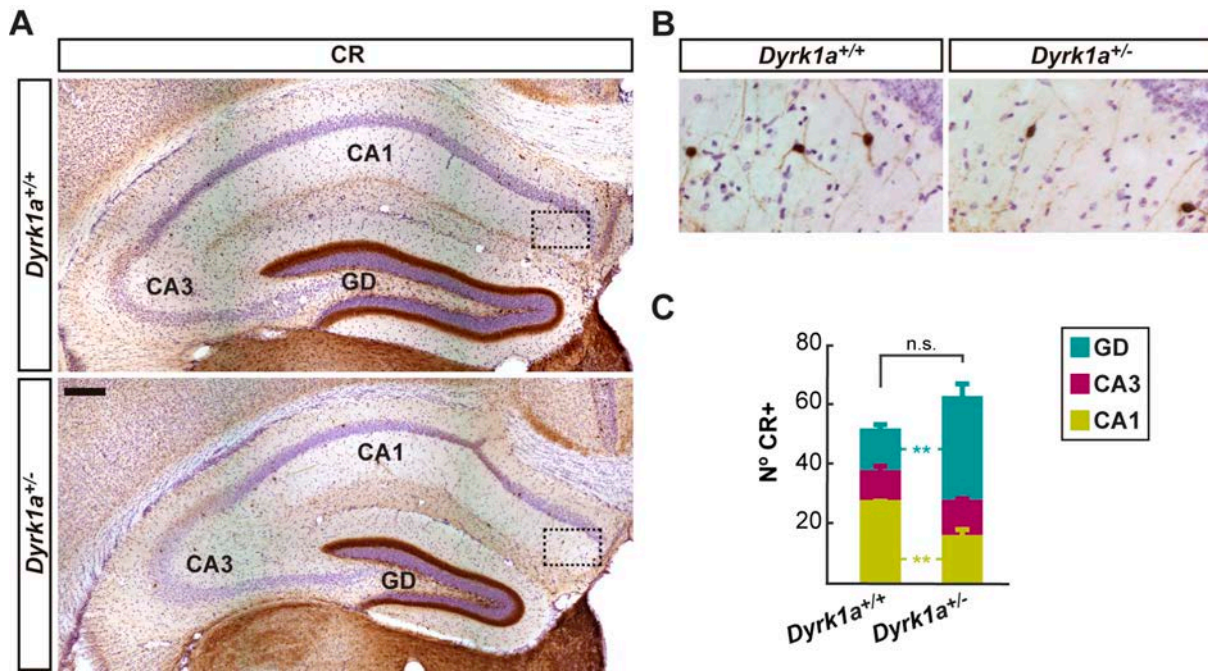


Figura 28. Número de interneuronas que expresan Calretinina en el hipocampo de ratones *Dyrk1a^{+/+}* y *Dyrk1a^{+/-}* adultos. **(A)** Imágenes representativas de secciones del hipocampo de ratones de 2 meses de edad de ambos genotipos inmunomarcadas con Calretinina (CR) y contrateñidas con Nissl. **(B)** Ampliaciones de la región de la CA1 marcada con un rectángulo en **A**, donde se ven células CR+ (puntas de flecha). **(C)** Histograma mostrando el número de interneuronas CR+ en la CA1, CA3 y GD del hipocampo de ratones *Dyrk1a^{+/+}* y *Dyrk1a^{+/-}*. Los valores corresponden a la media \pm E.E.M. ** $p < 0,01$ ($n = 3$ animales por genotipo), n.s.: no significativo. Barra de escala en **A**: 200 μ m.

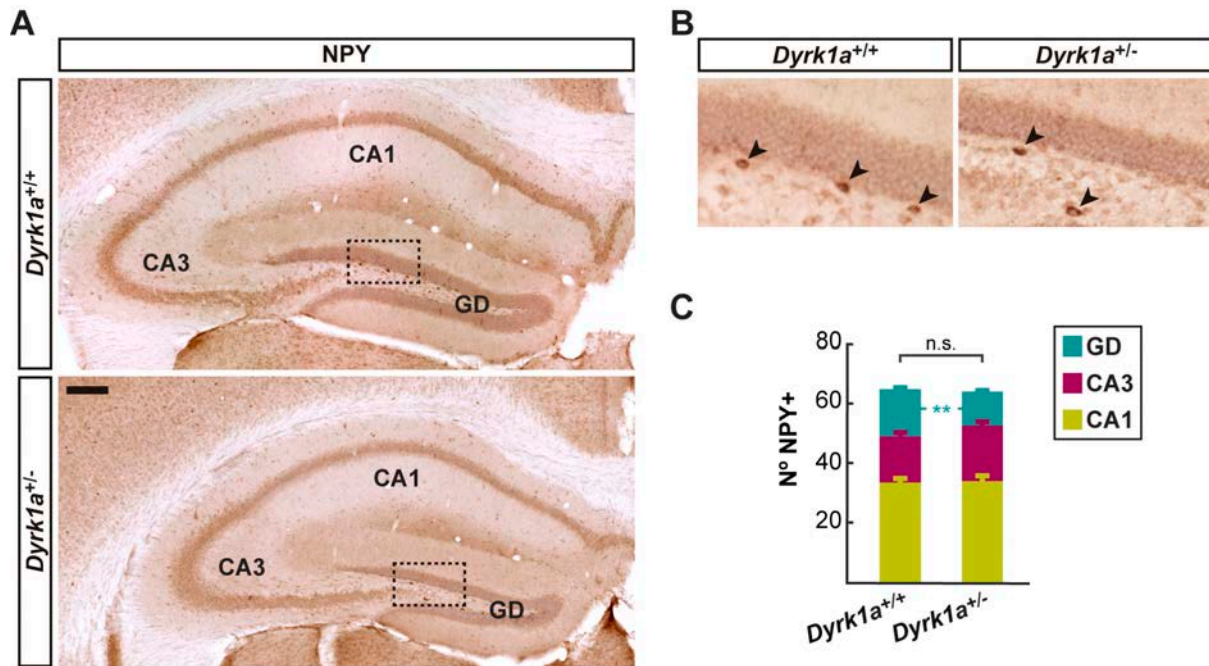


Figura 29. Número de interneuronas que expresan neuropéptido Y en el hipocampo de ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} adultos. (A) Imágenes representativas de secciones del hipocampo de ratones de 2 meses de edad de ambos genotipos inmunomarcadas con neuropéptido Y (NPY) y contrateñidas. (B) Ampliaciones de la región del giro dentado (GD) marcada con un rectángulo en A donde se indican (puntas de flecha) células NPY+. (C) Histograma mostrando el número de interneuronas NPY+ en la CA1, CA3 y GD del hipocampo de ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-}. Los valores corresponden a la media ± E.E.M. **p < 0,01 (*Dyrk1a*^{+/+}, n = 3; *Dyrk1a*^{+/-}, n = 4), n.s.: no significativo. Barra de escala en A: 200 μm.

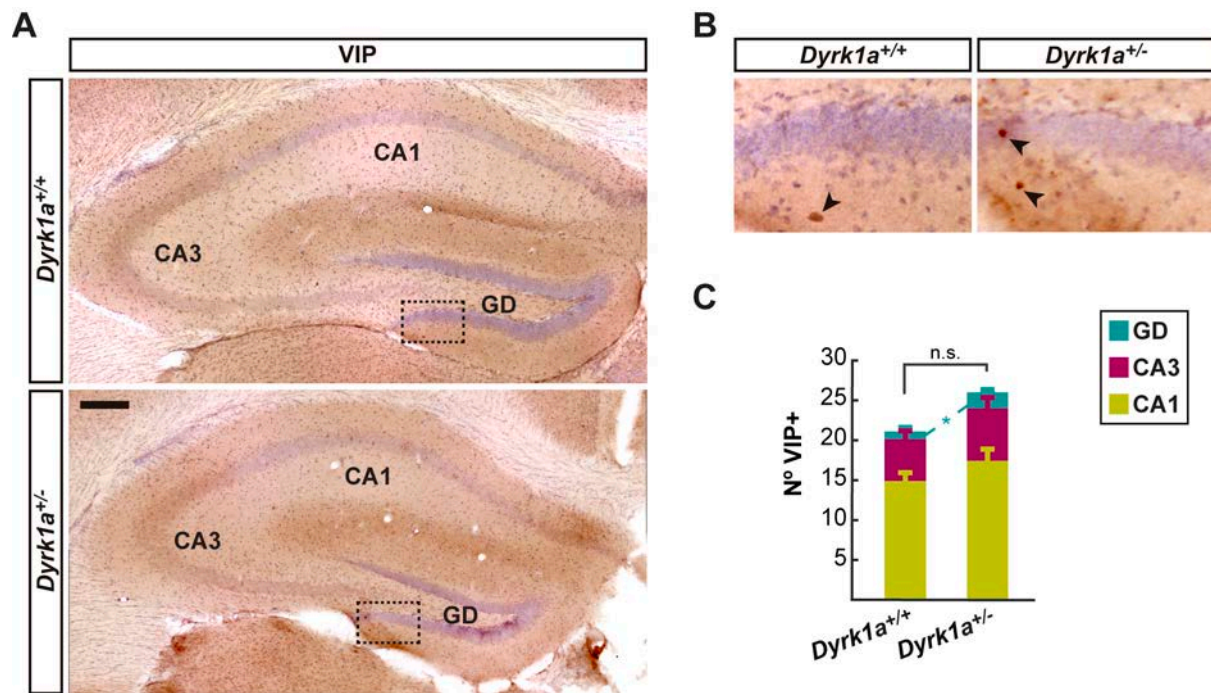


Figura 30. Número de interneuronas que expresan el péptido intestinal vasoactivo en el hipocampo de ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} adultos. **(A)** Imágenes representativas de secciones del hipocampo de ratones de 2 meses de edad de ambos genotipos inmunomarcadas con péptido intestinal vasoactivo (VIP) y contrateñidas con Nissl. **(B)** Ampliaciones de la región del giro dentado (GD) marcada con un rectángulo en **A** donde se indican (puntas de flecha) células VIP+. **(C)** Histograma mostrando el número de interneuronas VIP+ en la CA1, CA3 y GD del hipocampo de ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-}. Los valores corresponden a la media ± E.E.M. *p < 0,05 (*Dyrk1a*^{+/+}, n = 5; *Dyrk1a*^{+/-}, n = 4), n.s.: no significativo. Barra de escala en **A**: 200 μm.

Tabla 5. Número de neuronas en la corteza cerebral de ratones mutantes *Dyrk1a*

Marcador celular	<i>mBACTgDyrk1a</i>		<i>Dyrk1a</i> ^{+/-}	
	CSS		CSS	Hipocampo P60
Nurr1	↓ P7		↑ P7	S.D.
NeuN	↓ P7 ^A y P60 ^B		↑ P7 y P60	S.D.
Tbr1	↓ P7 ^{A,C}		↑ P7 ^{A,C}	S.D.
Ctip2	= P7 ^{A,C}		↑ P7	S.D.
Cux1/Mef2c	↓ P7 ^C		↓ P7	S.D.
GABA	= P60		↑ P60	S.D.
PV	↓ P14 y P60 ^A		= P14 y P60	↑ CA3
SST	↑ P14 y P60 ^A		= P14 y P60	↑ CA1
CR	↑ P14 y P60 ^A		↓ P14; = P60	↑ GD; ↓ CA1
NPY	S.D.		= P60	↓ GD
VIP	S.D.		= P60	↑ GD

CSS: corteza somatosensorial. S.D.: Sin datos. A: Najas, 2014; B: Guedj y col., 2012; C: Najas y col., 2015.

5. Efecto de la pérdida de función de *Dyrk1a* en el número de sinapsis de la corteza cerebral adulta

Los resultados presentados hasta el momento muestran que los ratones adultos jóvenes (2 meses de edad) *Dyrk1a*^{+/-} tienen un exceso de neuronas glutamatérgicas (excitadoras) en todas las capas de la neocorteza y de interneuronas GABAérgicas (inhibidoras) en las capas bajas (V-VI; ver Resultados, capítulo 3). Además, se han observado alteraciones en el número de interneuronas en el hipocampo de estos mutantes (ver Resultados, capítulo 4.2). En su conjunto, estos resultados sugieren que la conectividad sináptica de la corteza cerebral madura podría estar alterada en el modelo *Dyrk1a*^{+/-}. Para aportar evidencias sobre esta posibilidad, realizamos inmunofluorescencias dobles para marcar proteínas pre- y post-sinápticas (VGLUT1-Homer para las sinapsis excitadoras y VGAT-Gefirina para las sinapsis inhibidoras) y, de esta forma, poder estimar el número de sinapsis excitadoras e inhibidoras en regiones concretas de la CSS e hipocampo de ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} adultos (9 meses de edad).

5.1. Número de sinapsis en la corteza somatosensorial

Los recuentos de sinapsis excitadoras (interacciones VGLUT1-Homer; imágenes en Fig. 31A) e inhibidoras (interacciones VGAT-Gefirina; imágenes en Fig. 31B) en la CSS de los ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} se realizaron, tal y como se describe en Materiales y Métodos (ver capítulo 2.5), en las capas IV y VI de la CSS a tres niveles diferentes del eje rostro-caudal: rostral, medial y caudal. Los resultados del análisis estadístico global de los recuentos realizados en secciones de todos los animales incluidos en el experimento, revelaron que no había diferencias entre genotipos en la densidad de sinapsis en las tres regiones analizadas (rostral, medial y caudal) en las sinapsis excitadoras (capa IV: $F_{2,17} = 2,255$, $p = 0,135$; capa VI: $F_{2,16} = 1,665$, $p = 0,22$) ni en las sinapsis inhibidoras (capa IV: $F_{2,14} = 0,125$, $p = 0,883$; capa VI: $F_{2,14} = 0,647$, $p = 0,539$). Por consiguiente, el análisis de la densidad sináptica la realizamos teniendo en cuenta las imágenes de las tres regiones (rostral, medial y caudal) conjuntamente. La comparación entre genotipos de las densidades sinápticas medias en todas las secciones reveló un aumento significativo de sinapsis excitadoras en los ratones *Dyrk1a*^{+/-} respecto a los *Dyrk1a*^{+/+} tanto en la capa IV ($F_{1,10} = 9,531$, $p = 0,011$) como en la capa VI ($F_{1,10} = 11,805$, $p = 0,006$; Fig. 31A) de la neocorteza. Por el contrario, las densidades de sinapsis inhibidoras no fueron significativamente distintas entre genotipos, ni en la capa IV ($F_{1,10} = 2,919$, $p = 0,116$) ni en la capa VI ($F_{1,10} = 2,869$, p

= 0,119) de la neocorteza. Estos resultados estarían de acuerdo con una sobre-excitación de los circuitos corticales en los ratones *Dyrk1a*^{+/-}.

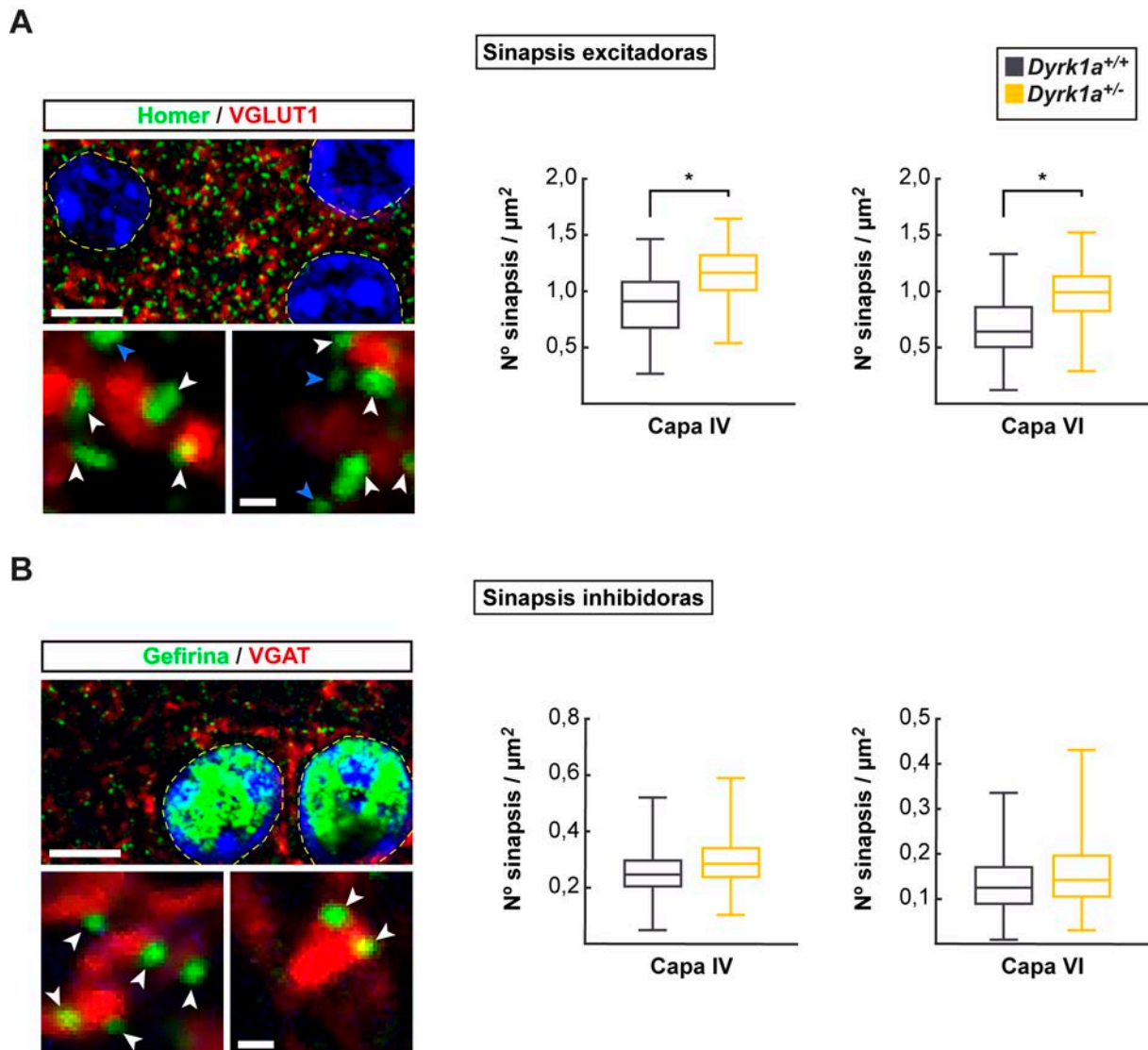


Figura 31. Densidad de sinapsis excitadoras e inhibitoras en las capas IV y VI de la corteza somatosensorial (CSS) de ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} adultos. (A, B) Imágenes representativas de secciones de la CSS de ratones *Dyrk1a*^{+/+} de 5 meses de edad inmunomarcadas con Homer y VGLUT1 (A) o con Gefirina y VGAT (B) y los núcleos teñidos con DAPI. Las imágenes inferiores en A y B corresponden a dos ampliaciones donde se puede observar interacciones (indicadas por puntas de flecha blancas) Homer-VGLUT1 (sinapsis excitadoras, imágenes en A) y Gefirina-VGAT (sinapsis inhibitoras, imágenes en B). Las puntas de flecha azules en las imágenes ampliadas en A muestran partículas Homer+ que no interactúan con partículas VGLUT1+. Las interacciones de partículas pre y post-sinápticas se contaron en el área excluida por los núcleos definidos con la tinción DAPI (líneas discontinuas amarillas en las imágenes superiores en A y B). Los diagramas de cajas en A y B muestran, respectivamente, las densidades de sinapsis excitadoras e inhibitoras situadas entre los cuartiles 1 y 3. La línea del interior de las cajas corresponde al valor de la mediana (Imágenes de sinapsis excitadoras: capa IV: *Dyrk1a*^{+/+} = 639, *Dyrk1a*^{+/-} = 661; capa VI: *Dyrk1a*^{+/+} = 639, *Dyrk1a*^{+/-} = 643. Imágenes de sinapsis inhibitoras: capa IV: *Dyrk1a*^{+/+} = 601, *Dyrk1a*^{+/-} = 539; capa VI: *Dyrk1a*^{+/+} = 615, *Dyrk1a*^{+/-} = 535; n = 6 animales por genotipo). Las diferencias entre genotipos fueron significativas en las sinapsis excitadoras (*p < 0,05, test ANOVA univariante), tanto en la capa IV como en la capa VI, pero no en las sinapsis inhibitoras. Las barras de escala en las imágenes superiores e inferiores (ampliaciones) corresponden a 5 μm y 0,5 μm respectivamente.

5.2. Número de sinapsis en el hipocampo

Los recuentos de sinapsis excitadoras e inhibitoras en el hipocampo de los ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} se realizaron en dos subregiones del *stratum radiatum* de la CA1: una cercana a la capa piramidal, que hemos denominado “dorsal”, y otra más alejada de la capa piramidal que hemos denominado “ventral” (ver Fig. 12B en Materiales y Métodos). Al analizar posibles diferencias en las densidades de sinapsis excitadoras entre subregiones, observamos que los ratones controles *Dyrk1a*^{+/+} tienen una mayor densidad de sinapsis excitadoras en la subregión ventral en comparación con la dorsal ($F_{1,10} = 7,895$, $p = 0,018$). Aunque este gradiente en la densidad de sinapsis no se observó en los ratones mutantes *Dyrk1a*^{+/-} que mostraron densidades medias de sinapsis excitadoras similares en las dos regiones ($F_{1,10} = 0,204$, $p = 0,611$; Fig. 32A). Sin embargo, cuando cuantificamos conjuntamente las sinapsis excitadoras en ambas regiones (dorsal y ventral) del *stratum radiatum*, no se encontraron diferencias significativas entre genotipos ($F_{1,11} = 1,464$, $p = 0,254$; Fig. 32A).

En los recuentos de sinapsis inhibitoras, a diferencia de lo que ocurre con las sinapsis excitadoras (ver Fig. 32A), se observa una diferencia en la densidad de las sinapsis inhibitoras en las dos regiones (dorsal y ventral; $F_{1,10} = 223,547$, $p < 0,001$). Aunque el efecto es similar en ambos genotipos ($F_{1,10} = 0,204$, $p = 0,661$; Fig. R20B), siendo la región dorsal del *stratum radiatum* la que presenta mayor densidad de sinapsis (Fig. 32B). Las cuantificaciones de las sinapsis inhibitoras conjuntamente en las dos regiones (dorsal y ventral), tampoco revelaron diferencias significativas entre los ratones *Dyrk1a*^{+/+} y los *Dyrk1a*^{+/-} ($F_{1,10} = 0,432$, $p = 0,526$; Fig. 32B).

En resumen, los resultados mostrados en esta sección indican que los ratones *Dyrk1a*^{+/-} tienen una mayor densidad de sinapsis excitadoras en la neocorteza, resultados que correlaciona con el exceso de neuronas excitadoras observada en la CSS de estos mutantes (Fig. 24E). Sin embargo, y a pesar del exceso de neuronas GABA+ en las capas profundas de la neocorteza de los mutantes *Dyrk1a*^{+/-} (Fig. 24D) y de los cambios de celularidad de las poblaciones mayoritarias de interneuronas observados en estos mutantes (Figs. 26-30), los recuentos de sinapsis inhibitoras no han revelado diferencias significativas entre genotipos en las regiones corticales examinadas.

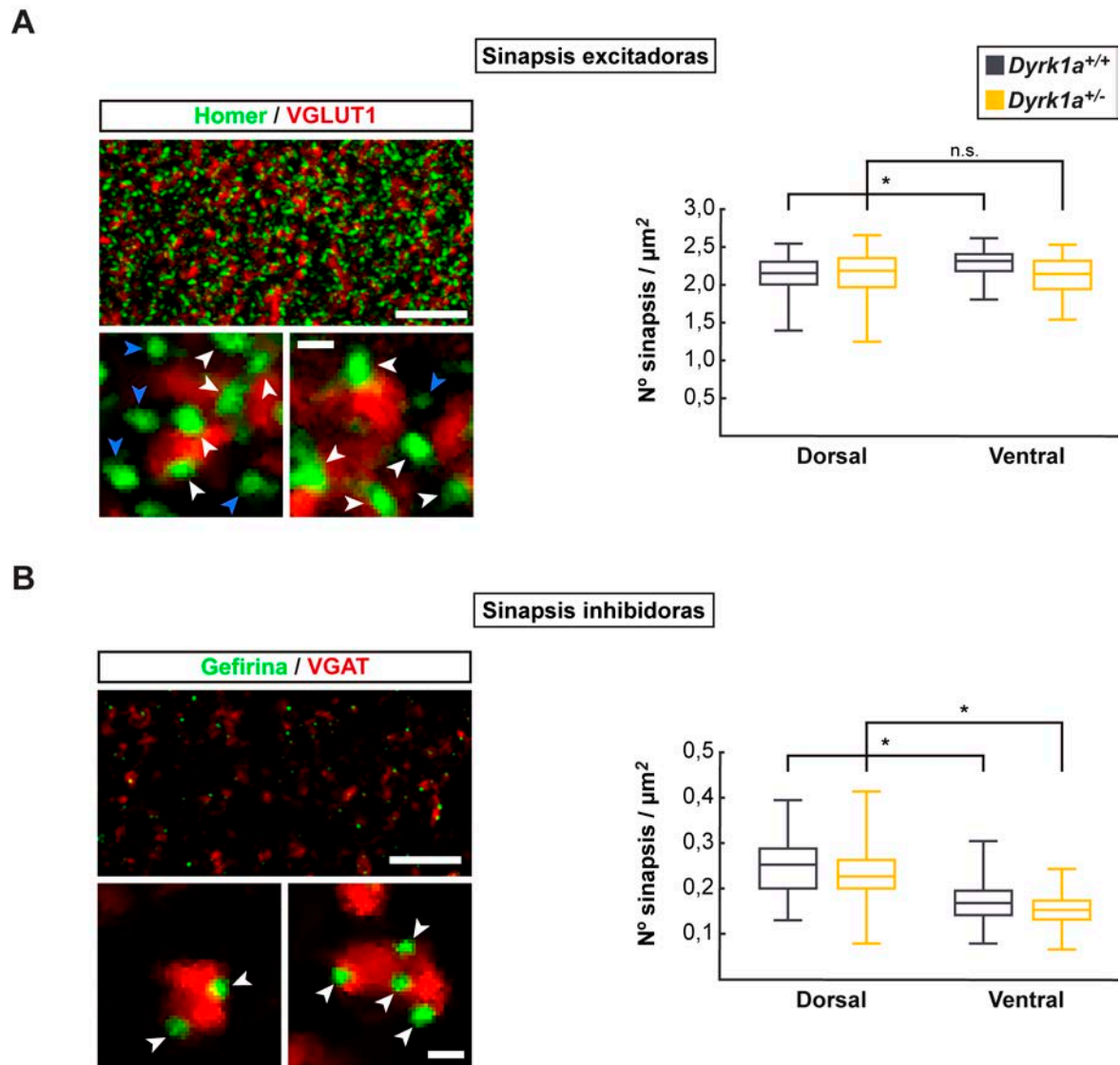


Figura 32. Densidad de sinapsis excitadoras e inhibitoras en la capa *stratum radiatum* de la región CA1 del hipocampo de ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} adultos. (A, B) Imágenes representativas de secciones del *stratum radiatum* de la región CA1 del hipocampo de ratones *Dyrk1a*^{+/+} de 5 meses de edad inmunomarcadas con Homer y VGLUT1 (A) o con Gefirina y VGAT (B). Las puntas de flecha azules en las imágenes ampliadas en A muestran partículas Homer+ que no interaccionan con partículas VGLUT1+. Las interacciones de partículas pre y postsinápticas se contaron en el área excluida por los núcleos sobre imágenes tomadas en dos subregiones (dorsal y ventral) del *stratum radiatum*. La densidad de sinapsis excitadoras en estas dos subregiones es diferente en los ratones *Dyrk1a*^{+/+} pero no en los *Dyrk1a*^{+/-} (diagrama de cajas en A). También hay diferencias entre subregión en la densidad de sinapsis inhibitoras tanto en los ratones *Dyrk1a*^{+/+} como en los *Dyrk1a*^{+/-} (diagrama de cajas en B). Los diagramas de cajas indican las densidades de sinapsis situadas entre los cuartiles 1 y 3 y la línea del interior de la caja corresponde al valor de la mediana (Imágenes de sinapsis excitadoras: *Dyrk1a*^{+/+} = 647, *Dyrk1a*^{+/-} = 470. Imágenes de sinapsis inhibitoras: *Dyrk1a*^{+/+} = 466, *Dyrk1a*^{+/-} = 437; n = 6 animales por genotipo), n.s.: no significativo. Las barras de escala en las imágenes superiores e inferiores (ampliaciones) corresponden a 5 μm y 0,5 μm respectivamente.

6. Expresión de c-Fos en el hipocampo de ratones *Dyrk1a*^{+/-}

Aproximadamente el 60% de los individuos con mutaciones en heterocigosis en el gen *DYRK1A* tienen epilepsia con presencia de ataques átonos y convulsiones mioclónicas generalizadas (revisado en van Bon y col., 2015a). También se han observado episodios epilépticos en condiciones de estabulación estándares en los ratones *Dyrk1a*^{+/-} a partir de los dos meses de edad. Esta actividad epiléptica está de acuerdo con el exceso de sinapsis corticales excitadoras de los mutantes *Dyrk1a*^{+/-} adultos descrito en el apartado anterior (Fig. 31A). Para aportar alguna evidencia sobre una posible sobre-activación cortical en estos mutantes, hemos realizado experimentos de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos frente al marcador c-Fos, un pro-oncogen de expresión temprana usado como indicador de actividad neuronal (Caubet, 1989; Morgan y col., 1987), en secciones cerebrales de ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} adultos (5 meses de edad) contrateñidas con Nissl (Fig. 33A, B). El recuento de neuronas c-Fos+ en las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo reveló un incremento de células inmunomarcadas del 85% en la región CA3 del hipocampo de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} ($p = 0,049$, prueba T de Student). El número de células c-Fos+ en las otras dos regiones del hipocampo (CA1 y GD) fueron muy similares en los dos genotipos (Fig. 33B, C). Estos resultados sugieren que la actividad neuronal basal de los circuitos corticales es mayor en los ratones *Dyrk1a*^{+/-} que en los *Dyrk1a*^{+/+}. Este exceso de actividad, podría contribuir a las crisis epilépticas que hemos observado en los mutantes *Dyrk1a*.

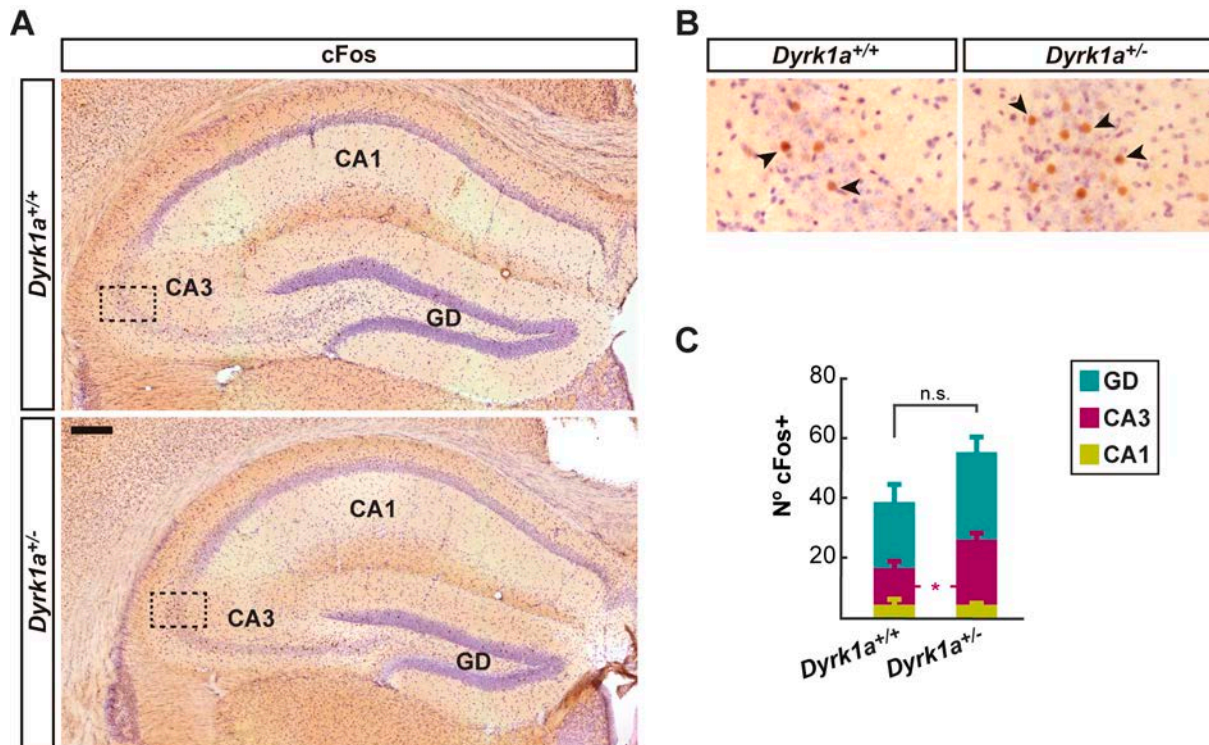


Figura 33. Número de neuronas inmunomarcadas con c-Fos en el hipocampo de ratones *Dyrk1a^{+/+}* y *Dyrk1a^{+/-}* adultos. (A) Imágenes representativas de secciones del hipocampo inmunomarcadas con c-Fos y contrateñidas con Nissl de ratones de 5 meses de edad de ambos genotipos. **(B)** Ampliaciones de la región de la CA3 marcada con un rectángulo en **A**. Las puntas de flecha indican algunas de las células c-Fos inmunopositivas. **(C)** Histograma mostrando el número de células c-Fos+ en la CA1, CA3 y giro dentado (GD) del hipocampo de ratones *Dyrk1a^{+/+}* y *Dyrk1a^{+/-}*. Los valores corresponden a la media \pm E.E.M. (*Dyrk1a^{+/+}*, n = 3; *Dyrk1a^{+/-}*, n = 4). Las diferencias entre genotipos fueron significativas (*p < 0,05) únicamente en la región CA3, n.s.: no significativo. Barra de escala en **A**: 200 μ m.

7. Estudios conductuales en el ratón *Dyrk1a*^{+/-}

Como se ha citado en la introducción (apartado 3.2), mutaciones *de novo* en el gen *DYRK1A* causan una forma sindrómica de DI y autismo (van Bon y col., 2015a). El TEA se caracteriza por presentar alteraciones en la interacción social, déficits en la comunicación y movimientos repetitivos y/o estereotipados. La presencia de estas conductas alteradas se pueden poner de manifiesto en el ratón realizando pruebas conductuales específicas (Silverman y col., 2010). En este trabajo hemos ampliado la caracterización conductual del modelo *Dyrk1a*^{+/-} realizando dos de estas pruebas comportamentales: la prueba de las canicas enterradas y la prueba de interacción social. Las pruebas se realizaron secuencialmente en un grupo de ratones machos *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} de 4-6 meses de edad.

7.1. Prueba de las canicas enterradas

La prueba de las canicas enterradas es una prueba conductual diseñada para evaluar los movimientos repetitivos o estereotipados de los ratones. Esta prueba se basa en la reacción defensiva innata que tienen los roedores ante la presencia de objetos que pueden resultar nocivos o ante la presencia de objetos novedosos e inofensivos. Esta reacción se llama enterramiento defensivo. En los roedores estabulados, el enterramiento defensivo consiste en empujar la viruta que cubre la base de la jaula hacia el objeto (nocivo o novedoso) con movimientos alternados de sus patas delanteras y del hocico con la finalidad de ocultarlo (De Boer y Koolhaas, 2003). La prueba consiste en enterrar objetos novedosos en la viruta de una jaula de estabulación convencional. Estos objetos son 12 canicas de cristal que se ponen en 2 filas sobre la viruta a distancias equidistantes (ver Materiales y Métodos, capítulo 3.2). La capacidad de realizar enterramientos defensivos se evaluó en un grupo de 15 ratones *Dyrk1a*^{+/+} y 15 *Dyrk1a*^{+/-} contando las canicas que entierra cada ratón en los videos registrados durante los 20 min que duró la prueba. También se contaron los enterramientos defensivos (en los que entierran canicas) y los no defensivos (en los que no entierran canicas) realizados en la viruta de la jaula de experimentación y, el tiempo total que el animal dedica a estos dos tipos de enterramientos.

Todos los ratones *Dyrk1a*^{+/-} realizaron enterramientos y el tiempo medio dedicado a los enterramientos por animal fue superior a 1,5 min. Al estudiar la naturaleza de los enterramientos se observó que el 85% de los enterramientos en los ratones del grupo control fueron realizados con las patas delanteras y el 15% con las patas traseras (Fig. 34A).

Además, la mayoría de los enterramientos se realizaron donde estaban las canicas y tan solo el 10% de ellos se realizaron en las esquinas de la jaula libres de canicas (Fig. 34B). Al cuantificar las canicas enterradas, se observó que 12 de los 15 ratones controles *Dyrk1a*^{+/+} evaluados (el 80%) fueron capaces de enterrar por lo menos 1 canica durante la prueba. También se observó en este grupo de ratones un aumento progresivo en el número medio de canicas enterradas a medida que avanzaba la prueba (Fig. 34C).

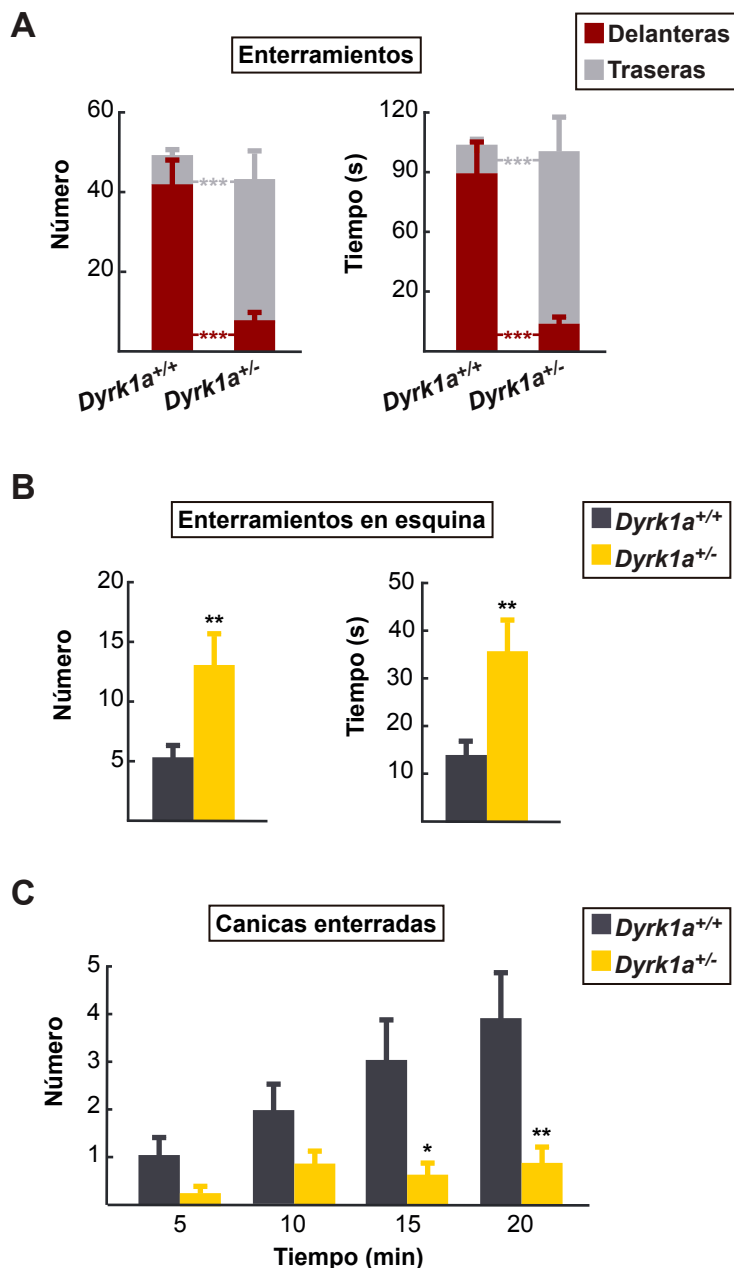


Figura 34. Ejecución de la prueba de las canicas enterradas de los ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} adultos. (A) Número de enterramientos defensivos (realizados con las patas delanteras) y no defensivos (con las traseras) y duración de los mismos durante los 20 min de la prueba. (B) Número de enterramientos totales no defensivos realizados en las esquinas de la jaula y duración de los mismos. (C) Número de canicas enterradas durante los 4 intervalos de 5 min en los que se dividió la prueba. Los valores corresponden a la media ± EEM. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (*Dyrk1a*^{+/+}, n = 15; *Dyrk1a*^{+/-}, n = 15).

El comportamiento de los ratones mutantes *Dyrk1a*^{+/-} en esta prueba fue significativamente distinto al de los ratones control. Aunque los ratones mutantes *Dyrk1a*^{+/-} realizan un número medio de enterramientos totales similar al de los ratones control ($p = 0,39$, prueba U de Mann-Whitney) y no hay diferencias significativas entre genotipos en la duración total de los enterramientos ($p = 0,88$, prueba U de Mann-Whitney; Fig. 34A), al analizar la naturaleza de estos enterramientos se observó que los ratones *Dyrk1a*^{+/-} presentan un déficit en el comportamiento defensivo típico de los roedores, puesto que más del 80% de los enterramientos fueron realizados con ayuda de las patas traseras y no con las delanteras. En este caso se observaron diferencias muy significativas entre genotipos (ver Fig. 34A) tanto en el número medio de enterramientos no defensivos ($p = 0,0001$, prueba U de Mann-Whitney) como en el tiempo utilizado para realizar estos enterramientos ($p = 0,0001$, prueba U de Mann-Whitney). Además, tal como se observa en los histogramas de la Fig. 34B, los ratones *Dyrk1a*^{+/-} realizaron muchos más enterramientos en las esquinas de la jaula que los controles de camada ($p = 0,008$, prueba U de Mann-Whitney), siendo el tiempo dedicado a estos enterramientos muy superior al de los controles ($p = 0,003$, prueba U de Mann-Whitney). Este comportamiento anómalo en la forma y lugar de realizar los enterramientos de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} se correlacionó con una menor capacidad para realizar enterramientos defensivos que cubrieran las canicas. El porcentaje de ratones *Dyrk1a*^{+/-} que enterraron al menos una canica se redujo del 80% en los controles al 45 % en los mutantes (tan sólo 7 de los 15 ratones *Dyrk1a*^{+/-} evaluados enterraron canicas). Además, el número medio de canicas enterrados durante los 20 min de la prueba fue significativamente inferior en los ratones *Dyrk1a* mutantes que en los controles (*Dyrk1a*^{+/+}: 3,93 canicas, *Dyrk1a*^{+/-}: 0,93 canicas; $p = 0,01$, prueba U de Mann-Whitney). Al contrario de lo que ocurrió en el grupo control, los ratones *Dyrk1a*^{+/-} no mejoraron su capacidad para realizar enterramientos defensivos a medida que avanzaba la prueba, pues los animales enterraron un número muy similar de canicas durante los 5 min primeros y últimos de la prueba (Fig. 34C).

El bajo número de canicas que entierran los ratones *Dyrk1a*^{+/-} en comparación con los controles podría ser consecuencia de una reducida capacidad exploratoria de los ratones mutantes ante un objeto novedoso. Para estudiar esta posibilidad, se contaron las veces que los ratones entraban en la zona central de la jaula donde se distribuyeron las canicas y se contó el tiempo que el ratón permanecía en esta zona de la jaula. Los ratones control realizaron un número elevado de entradas al centro de la jaula que fue similar al realizado por los ratones *Dyrk1a*^{+/-} (*Dyrk1a*^{+/+}: 41 entradas, *Dyrk1a*^{+/-}: 35 entradas; $p = 0,51$, prueba U de Mann-Whitney). Sin embargo, las entradas de los ratones mutantes fueron más cortas que la de los controles, siendo el tiempo medio de permanencia de éstos en el centro de la

jaula muy inferior al de los ratones *Dyrk1a^{+/+}* (*Dyrk1a^{+/+}*: 288 s, *Dyrk1a^{+/-}*: 133 s; $p = 0,001$, prueba U de Mann-Whitney). Estos resultados indican una falta de motivación no social ante un objeto novedoso no aversivo en los ratones *Dyrk1a^{+/-}*.

En la prueba de las canicas enterradas se cuantificaron también los autoacicalamientos con una duración igual o mayor de 3 s. Los autoacicalamientos son movimientos típicos de aseo en roedores que consisten en lamerse las plantas de las patas delanteras para luego extender la saliva por el resto del cuerpo, principalmente por el hocico y el resto de la cabeza. Cuando los acicalamientos son largos y repetitivos se consideran estereotipias (Chung y col., 2015; Sungur y col., 2014). Las observaciones de las grabaciones de video evidenciaron acicalamientos de una duración igual o mayor a 3 s en todos los ratones, tanto en los *Dyrk1a^{+/+}* como en los *Dyrk1a^{+/-}*. Sin embargo, el número medio de los acicalamientos fue significativamente superior en los animales *Dyrk1a^{+/-}* que en los controles (*Dyrk1a^{+/+}*: 5,0 acicalamientos, *Dyrk1a^{+/-}*: 9,5 acicalamientos; $p = 0,004$, prueba U de Mann-Whitney). También fue superior el tiempo que los ratones mutantes dedicaron a acicalarse durante la duración de la prueba (*Dyrk1a^{+/+}*: 22 s, *Dyrk1a^{+/-}*: 50 s; $p = 0,003$, prueba U de Mann-Whitney; Fig. 35A). Además, todos los ratones *Dyrk1a^{+/-}* evaluados realizaron repetidamente otro movimiento cuando permanecían en el centro de la jaula que únicamente se observó en 3 de los 15 ratones *Dyrk1a^{+/+}* evaluados. Este comportamiento consistía en realizar contactos olfativos y mordiscos en las canicas, acompañado de movimientos con las patas delanteras. El número medio de estos movimientos y su duración en el grupo de ratones control fue muy bajo (0,4 veces, 2 s). En contraposición, los ratones *Dyrk1a^{+/-}* realizaron este movimiento muchas más veces (5,5 veces) siendo la duración media de estos movimientos (32 s) muy superior al de los ratones control ($p = 0,0001$, prueba U de Mann-Whitney; Fig. 35B).

Estos resultados indican un comportamiento estereotipado en los ratones *Dyrk1a^{+/-}* que concuerda con el bajo número de canicas enterradas por los mismos durante la prueba (Fig. 34C). Alteraciones semejantes a las observadas en los ratones *Dyrk1a* mutantes en esta prueba han sido descritas previamente en otros modelos de autismo como el ratón *Ephrin-A2^{-/-}A3^{-/-}*, ratón doble mutante nulo para efrina A2 y A3, que son moléculas de la superficie celular con importantes funciones durante el desarrollo (Wurzman y col., 2015); el ratón *Cntnap2^{-/-}*, mutante nulo para una proteína de adhesión celular (del inglés, *contactin associated protein-like 2*, *Cntnap2*) de la familia de las neurexinas que interviene en la diferenciación axonal y en la adhesión sináptica (Peñagarikano y col., 2011); y el ratón *Shank3B^{-/-}*, ratón mutante nulo para una proteína clave de la densidad post-sináptica (del inglés, *postsynaptic density protein*, *PSD*) en las sinapsis excitadoras (Peça y col., 2011).

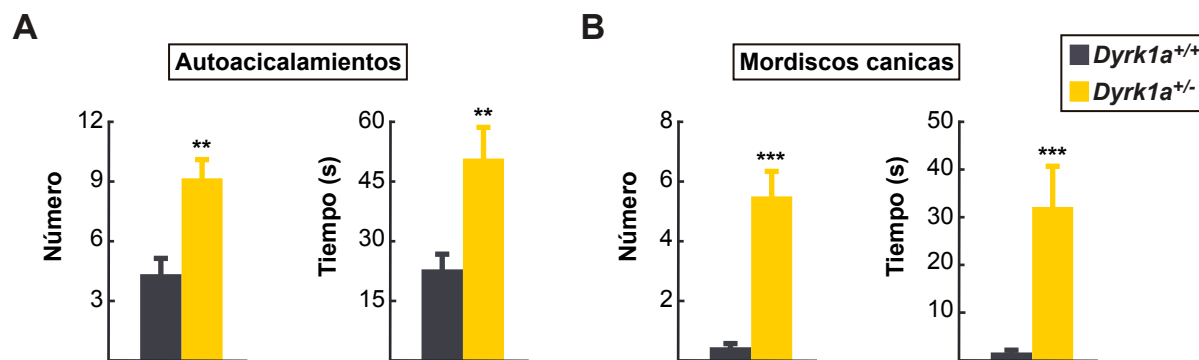


Figura 35. Evaluación de movimientos repetitivos y estereotipias realizados por ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} en la prueba de las canicas enterradas. Los histogramas muestran el número y la duración de los autoacicalamientos mayores o iguales a 3 segundos (A) y de los mordiscos a las canicas (B) realizados por los ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} a lo largo de los 20 minutos que dura la prueba. Los valores corresponden a la media \pm EEM. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (*Dyrk1a*^{+/+}, $n = 15$; *Dyrk1a*^{+/-}, $n = 15$).

7.2. Prueba de interacción social

Esta prueba, también denominada *prueba del residente-intruso* está diseñada para evaluar la interacción social recíproca de un ratón (Bolivar y col., 2007). Tal como se describe en el capítulo 3.1 de Materiales y Métodos, la prueba consiste en introducir al ratón de estudio o residente (*Dyrk1a*^{+/+} o *Dyrk1a*^{+/-}) en una jaula de estabulación convencional con viruta limpia en su interior. Tras 5 min de familiarización con la jaula, se introduce en la jaula al ratón intruso y se permite la libre interacción entre los dos ratones durante los 5 min que duró la prueba. Todos los ratones residentes se evaluaron utilizando un único macho intruso del mismo acervo genético (C57BL6/J-129) y edad que el ratón residente. En esta prueba se cuantificaron el número y la duración de los contactos olfativos, que pueden ser oral-oral u oral-genital en los 25 ratones residentes evaluados; 13 *Dyrk1a*^{+/+} y 12 *Dyrk1a*^{+/-}. Otros parámetros que se cuantificaron para evaluar la conducta social recíproca de los ratones macho adultos fueron el número y duración de persecuciones, montas (a modo de cópula) y luchas (del inglés "*Wrestling*"; Bolivar y col., 2007).

Los ratones controles *Dyrk1a*^{+/+} demostraron una interacción social recíproca normal. Todos los animales testados realizaron contactos olfativos (oral-oral y oral-genital) con el ratón intruso. Estos contactos fueron mayoritariamente cortos, de una duración menor o igual a 5 s, siendo menos frecuentes los contactos de mayor duración (Fig. 36A). Los ratones controles residentes realizaron contactos olfativos durante aproximadamente el 40% del tiempo que duró la prueba (Fig. 36A). Además, todos los ratones control realizaron persecuciones. Sin embargo, sólo 8 de los 13 ratones control evaluados realizaron luchas contra el ratón intruso y únicamente uno de ellos realizó alguna monta. Este comportamiento

de los ratones control está de acuerdo con datos publicados por Bolivar y colaboradores (2007) donde se observa un elevado número de contactos olfativos y seguimientos en cepas de ratón con interacción social dentro de la normalidad. Tal como se puede observar en los histogramas de la Fig. 36A, el comportamiento de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} en esta prueba de interacción social fue significativamente distinto al de los ratones controles. Los ratones mutantes *Dyrk1a*^{+/-} realizaron menos contactos olfativos, oral-oral y oral-genital, que los ratones control *Dyrk1a*^{+/+} ($p = 0,005$, prueba U de Mann-Whitney). Además, la duración media de los contactos olfativos de los mutantes *Dyrk1a*^{+/-} con el ratón intruso fue significativamente menor que la de los controles ($p = 0,0001$, prueba U de Mann-Whitney). Esta diferencia fue debida a una disminución significativa de contactos largos (duración mayor o igual a 6 s) en estos ratones (Fig. 36A). Aunque la mayoría de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} (11 de 12) realizaron persecuciones, únicamente uno de ellos realizó alguna lucha y ninguno de ellos realizó alguna monta durante la prueba.

Estos resultados en su conjunto demuestran que la interacción social recíproca de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} es menor que la de los controles de camada. Alteraciones semejantes a las descritas aquí para el ratón *Dyrk1a*^{+/-} se han descrito previamente en los modelos de autismo *Cntnap2*^{-/-} (Peñagarikano y col., 2011) y *Shank3B*^{-/-} (Peça y col., 2011), que como ya hemos mencionado muestran también una ejecución deficiente de la prueba de las canicas enterradas.

La prueba de interacción social realizada se ha utilizado también para evaluar conductas estereotipadas. Para ello se cuantificaron, al igual que en la prueba anterior, los autoacicalamientos y los enterramientos repetitivos en la viruta (Chung y col., 2015; Sungur y col., 2014). Las observaciones de las grabaciones de video registradas durante los 5 min de la prueba mostraron que tan sólo 7 de los 13 ratones control evaluados (54%) realizaron autoacicalamientos con una duración igual o mayor a 3 s. Estos 7 ratones *Dyrk1a*^{+/+} realizaron un único acicalamiento (ver valores medios en la Fig. 36B). El porcentaje de ratones *Dyrk1a*^{+/-} evaluados que realizaron autoacicalamientos durante 3 s o más aumentó discretamente, hasta el 75% (9 de 12). Sin embargo, el número medio de acicalamientos en el grupo de ratones *Dyrk1a*^{+/-} fue tres veces superior al del grupo control ($p = 0,016$, prueba U de Mann-Whitney). El tiempo dedicado a los mismos fue también superior en los ratones mutantes que en los controles ($p = 0,014$, prueba U de Mann-Whitney; Fig. 36B). Al comparar entre los dos genotipos el número de enterramientos totales realizados con las patas delanteras o traseras se observó que 10 de los 13 ratones control realizaron algún enterramiento mientras que todos los ratones *Dyrk1a*^{+/-} realizaron enterramientos en la viruta de la jaula experimental. Además, se observó un aumento significativo en el número de enterramientos medios ($p = 0,022$, prueba U de Mann-Whitney) y en la duración de estos

enterramientos ($p = 0,01$, prueba U de Mann-Whitney) en los ratones *Dyrk1a*^{+/-} respecto a los controles *Dyrk1a*^{+/+} (Fig. 36C).

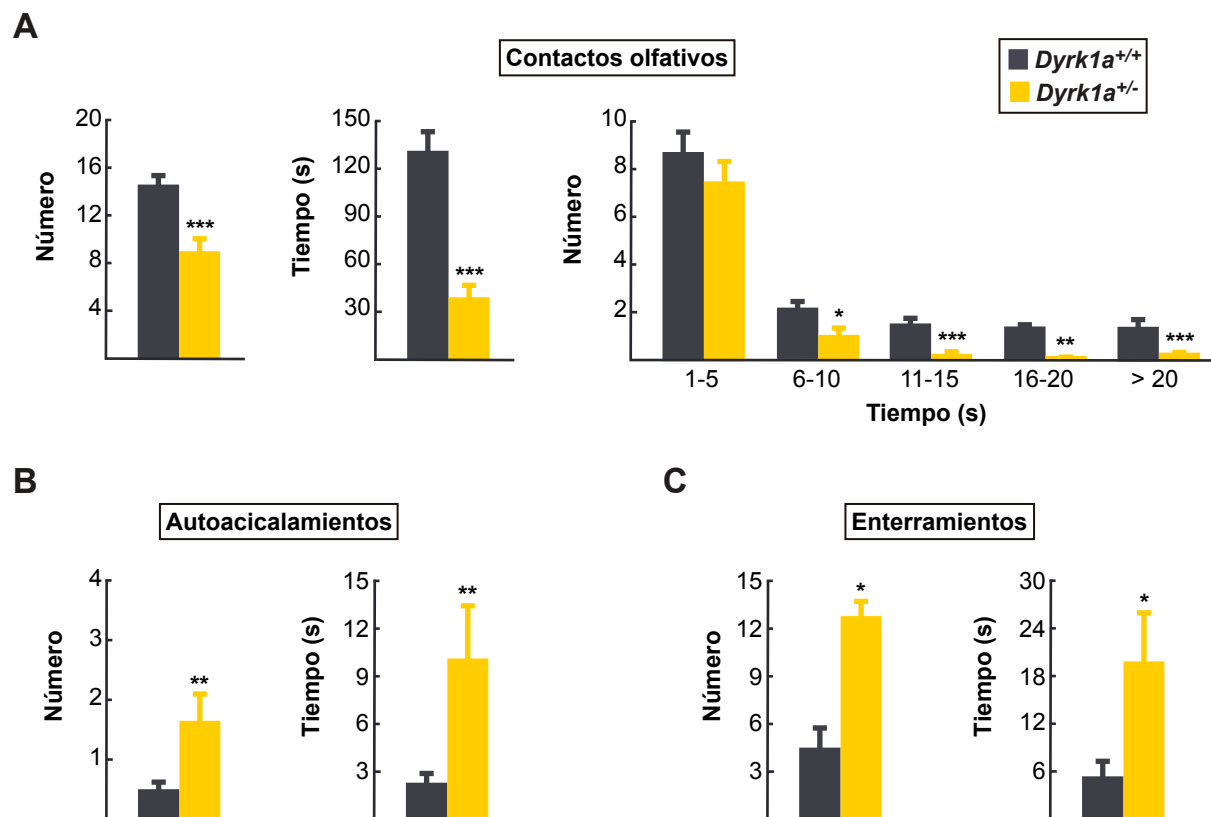


Figura 36. Ejecución de la prueba de interacción social residente – intruso de los ratones *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-} adultos. (A) Los histogramas de la izquierda muestran el número total de contactos olfativos realizados durante los 5 min de la prueba y la duración de los mismos. El histograma de la derecha representa el número de contactos olfativos realizados distribuidos según su duración. **(B, C)** Los histogramas muestran el número total de autoacicalamientos iguales o mayores a 3 s **(B)** y de enterramientos realizados en la viruta **(C)** durante la prueba y la duración total de estos autoacicalamientos **(B)** y enterramientos **(C)**. Los valores corresponden a la media \pm EEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (*Dyrk1a*^{+/+}, $n = 13$; *Dyrk1a*^{+/-}, $n = 12$).

El incremento de los autoacicalamientos y enterramientos no defensivos en la viruta de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} está de acuerdo con el mayor número de movimientos estereotipados observado en estos mutantes al realizar la prueba de las canicas enterradas.

En su conjunto, los resultados obtenidos en las prueba de interacción social y de las canicas enterradas indican que los ratones *Dyrk1a*^{+/-} presentan un déficit en el comportamiento social, debido a que la curiosidad interespecífica típica de los roedores se ve reducida. Además presentan características típicas de una conducta deletérea (movimientos estereotipados o repetitivos) no observada en los ratones controles *Dyrk1a*^{+/+}.

DISCUSIÓN

1. Implicación de DYRK1A en la formación de la subplaca

El tálamo junto con la corteza tienen un papel fundamental en el análisis y la integración de las funciones sensitivas y motoras (Perea-Bartolomé y Ladera-Fernández, 2004). Como ya se ha mencionado, las neuronas que forman la subplaca se generan en el telencéfalo dorso-lateral o *pallium* al inicio de la neurogénesis. Estas neuronas maduran en estadios tempranos del desarrollo embrionario, cuando la mayoría de las neuronas corticales de proyección todavía no se han generado o están migrando hacia la placa cortical, por lo que se les considera las neuronas “pioneras” de la corteza. Estas neuronas se sitúan entre la sustancia gris y la blanca y son fundamentales para que se establezcan correctamente las conexiones intra-corticales y las conexiones de la corteza con áreas subcorticales, especialmente con el tálamo (Garel y Lopez-Bendito, 2014; Hoerder-Suabedissen y Molnar, 2015). Los fenotipos de ratones mutantes que tienen una localización o celularidad aberrante de la subplaca han puesto de manifiesto la importancia de esta estructura para el desarrollo de la neocorteza. Ejemplos de estos mutantes son el ratón *Reeler* y el ratón *Gli3^{xt/xt}* (*extra toes*). Estos ratones tienen, respectivamente, mutaciones espontáneas en los genes que codifican a la Relina y al factor de transcripción Gli3. En los mutantes *Reeler*, la falta de la proteína de matriz extracelular Relina en las células de Cajal-Retzius impide que la preplaca se divida en zona marginal y subplaca. En consecuencia, la placa cortical crece por debajo de la subplaca formándose las mismas capas que en un ratón de genotipo control pero en un orden invertido (Steindler y Colwell, 1976). Este mutante tiene conexiones cortico-talámicas, además, las fibras del tálamo alcanzan la placa cortical y contactan con neuronas que tienen características de neuronas de capa IV, la capa de la corteza madura normalmente invadida por estas fibras (Molnar y col., 1998). En los mutantes *Gli3^{xt/xt}*, las células de la subplaca no se generan o no se diferencian adecuadamente y la laminación de la neocorteza está severamente afectada. En este mutante no hay conexiones córtico-talámicas y las aferentes que llegan del tálamo no alcanzan la placa cortical porque no son capaces de atravesar la barrera *pallium-subpallium* (Chen y col., 2012; Magnani y col., 2013).

Los ratones mutantes examinados en este trabajo; los ratones mBACTg*Dyrk1a*, *Dyrk1a^{+/-}* y Ts65Dn tienen subplaca y ésta se sitúa en la posición correcta. Sin embargo, se han observado alteraciones significativas en el número de células que forma esta capa en animales postnatales; un déficit de neuronas en los animales con 3 copias funcionales del gen *Dyrk1a* (ratones mBACTg*Dyrk1a* y Ts65Dn) y un exceso en los animales con 1 copia funcional del gen (el ratón *Dyrk1a^{+/-}*). En estos 3 mutantes y en sus respectivos controles, el número de neuronas NeuN+ de la subplaca es muy semejante al de las neuronas Nurr1+.

Estos resultados concuerdan con datos publicados en los que se demuestra que la mayoría de las neuronas de la subplaca en ratones postnatales expresan el factor de transcripción Nurr1 (Hoerder-Suabedissen y Molnar, 2013).

Alteraciones de celularidad semejantes a las de la subplaca (Figs. 13-15) se observaron también en la capa VI de la CSS de los ratones postnatales mBACTg*Dyrk1a*, Ts65Dn y *Dyrk1a*^{+/-} al cuantificar las neuronas que expresan el marcador de capa Tbr1 (Najas y col. 2015). Dado que las neuronas de la subplaca y capa VI son las primeras que se generan en el *pallium* y que en el período de generación de estas neuronas (entre E11-E13; Molyneaux y col., 2007) la neurogénesis está significativamente reducida en los embriones mBACTg*Dyrk1a* y Ts65Dn e incrementada en los embriones *Dyrk1a*^{+/-} (Najas y col., 2015), podemos concluir que los cambios de celularidad observados en la subplaca de los tres modelos de ratón examinados son debidos a defectos en la neurogénesis.

Tal como hemos mencionado con anterioridad, las neuronas de la subplaca maduran rápidamente y a E13,5 ya han extendido sus axones hacia la barrera *pallium-subpallium* donde se producirá el “encuentro” (*handshake*) con las aferentes corticales procedentes del tálamo que inervarán la subplaca y, posteriormente, la placa cortical (Garel y Lopez-Bendito, 2014; Hoerder-Suabedissen y Molnar, 2015). Estas proyecciones talámicas son fundamentales para la maduración de la circuitería cortical. Así por ejemplo, se ha podido demostrar recientemente que la inervación del tálamo de un tipo de interneuronas corticales, las neuronas SST+, durante la primera semana postnatal es importante para la correcta maduración de los estímulos inhibitorios que reciben las interneuronas PV+ situadas en las capas internas de la neocorteza que son las que modularán a las neuronas excitadoras que inervan el tálamo (Tuncdemir y col., 2016). La inmunotinción de marcadores axonales realizada en embriones E13,5 mostró que las neuronas de la subplaca en los embriones mBACTg*Dyrk1a* y *Dyrk1a*^{+/-} extienden sus axones por la zona intermedia igual que las neuronas de los embriones controles. Sin embargo, si que se observaron diferencias respecto a los controles en el área ocupada por las fibras marcadas; una disminución en los embriones mBACTg*Dyrk1a* y un aumento en los *Dyrk1a*^{+/-} (Figs. 16, 17). Estas diferencias indican alteraciones en el número de axones ya que correlacionan con el déficit y el exceso de neuronas corticales observado, respectivamente, en los embriones mutantes mBACTg*Dyrk1a* y *Dyrk1a*^{+/-} al inicio de la corticogénesis (Najas y col., 2015).

Una de las regiones cerebrales que presenta una mayor alteración de tamaño en los ratones mBACTg*Dyrk1a* y *Dyrk1a*^{+/-} es precisamente el tálamo. Los mutantes mBACTg*Dyrk1a* tienen un tálamo más grande mientras que los mutantes *Dyrk1a*^{+/-} lo tienen más pequeño. Los recuentos de neuronas realizados en núcleos talámicos revelaron

defectos de celularidad de sentido opuesto a los de la subplaca; más neuronas en el tálamo de los ratones mBACTg*Dyrk1a* y menos en el tálamo de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} (Fotaki y col. 2002; Guedj y col. 2012). A pesar de que los estudios realizados hasta el momento en el mutante *Dyrk1a*^{+/-} no han evidenciado cambios relevantes en la morfología de tractos neuronales (Fotaki y col., 2002; Laguna, 2008), sería interesante marcar las aferentes talámicas durante el desarrollo postnatal de los mutantes *Dyrk1a* para determinar posibles alteraciones en la morfología y/o función de las conexiones tálamo-corteza.

En el modelo de SD Ts16 con 3 copias del cromosoma MMU16 (ver Fig. 8), la subplaca en estadios tardíos del desarrollo embrionario presenta un déficit muy significativo de axones procedentes del tálamo. Estos embriones trisómicos presentan un retraso en la generación de neuronas corticales que afecta principalmente a las de la subplaca. En consecuencia, las neuronas de la subplaca en los embriones Ts16 empiezan a generarse cuando ya hay neuronas en la placa cortical (Cheng y col., 2004). Tal como sugieren los autores del trabajo, es posible que la menor inervación de la subplaca en los embriones trisómicos sea consecuencia de alteraciones en las conexiones corteza-tálamo debido al déficit de neuronas “pioneras” en el momento en que se establecen estas conexiones.

Como ya hemos mencionado, los embriones Ts65Dn presentan también un retraso significativo en la generación de neuronas corticales (Najas y col., 2015) que correlaciona con una disminución de neuronas de la subplaca en estadios post-natales. Por tanto, podríamos especular que los defectos en la generación de neuronas de la subplaca en los modelos de SD Ts16 y Ts65Dn son consecuencia de la sobre-expresión de uno o varios genes situados en la región del cromosoma MM16 que tienen en común ambos modelos (Fig. 8). Los estudios de rescate genético realizados en nuestro laboratorio demostraron que los defectos en la neurogénesis cortical temprana de los embriones Ts65Dn son debidos a la sobre-expresión de DYRK1A (Najas y col. 2015). El hecho de que los ratones postnatales mBACTg*Dyrk1a* y Ts65Dn con niveles de proteína DYRK1A semejantes (Guedj y col., 2012; Souchet y col., 2014), tengan un déficit de neuronas de la subplaca y que el este déficit se normalice en los ratones Ts65Dn con dos copias funcionales del gen *Dyrk1a* (Figs. 13, 15), indican que *Dyrk1a* es el gen de la región trisómica responsable de la hipocelularidad de la subplaca en el modelo Ts65Dn. Estos resultados en su conjunto, indican que los defectos en la generación de neuronas de la subplaca podrían contribuir a las alteraciones funcionales de los circuitos corticales del ratón Ts65Dn (Cramer y col., 2015). Al igual que en este modelo de ratón, la neocorteza de fetos y niños con SD presenta una marcada hipocelularidad (Golden y Hyman, 1994; Larsen y col., 2008; Schmidt-Sidor y col., 1990). Por tanto, aunque no se ha reportado, es posible que la subplaca en cerebros con trisomía del HSA21 tengan defectos similares a los observados en los modelos de ratón Ts65Dn

(Fig. 15) y Ts16 (Cheng y col., 2004).

Estudios anatómicos y de imagen por resonancia magnética han revelado que los individuos con TEA tienen una baja definición del límite entre la sustancia blanca y la gris, especialmente en la corteza pre-frontal, debido a un exceso de neuronas intersticiales (Avino y Hutsler, 2010; Bailey y col., 1998; Hutsler y col., 2007; Simms y col., 2009). El origen de estas neuronas se desconoce pero se cree que son neuronas remanentes de la subplaca. Esto, ha llevado a proponer que la neurogénesis cortical temprana podría estar incrementada en algunos tipos de TEA (McFadden y Minshew, 2013). Otra observación que relaciona la subplaca con el TEA es el enriquecimiento de genes de susceptibilidad al TEA que se expresan de forma específica en la subplaca del ratón en desarrollo (Hoerder-Suabedissen y col., 2013). Como discutiremos más adelante, el ratón *Dyrk1a*^{+/-} presenta conductas que son características del autismo. Por tanto, el exceso de neuronas de la subplaca observado en este ratón está de acuerdo con la hipótesis de que la sobreproducción de neuronas de la subplaca es uno de los mecanismos patogénicos en el TEA (McFadden y Minshew, 2013).

Uno de los genes de autismo identificado junto con *DYRK1A* en los estudios genéticos de secuenciación masiva es el gen *TBR1* (O'Roak y col., 2012a). El factor de transcripción TBR1 se expresa abundantemente en la subplaca. El ratón knockout de *Tbr1* tiene una neocorteza semejante a la del mutante *Reeler* con un déficit muy severo de neuronas de la subplaca y de capa VI. Este ratón también presenta alteraciones importantes en las proyecciones córtico-talámicas y talámico-corticales que no llegan a proyectar en las neuronas diana (Hevner y col., 2001). Las mutaciones en el gen *TBR1* son dominantes y, al igual que las mutaciones en *DYRK1A*, se asume que son de pérdida de función. A pesar del severo fenotipo cortical del ratón *Tbr1*^{-/-}, el grosor y laminación de la neocorteza y las proyecciones intra-corticales, córtico-talámicas y talámico-corticales en los ratones *Tbr1*^{+/-} haploinsuficientes parecen preservadas. Sin embargo, si que se han observado en estos ratones alteraciones funcionales, por ejemplo en la circuitería de la amígdala, que podrían explicar el comportamiento autista de los individuos con mutaciones en el gen *TBR1*. El fenotipo de los ratones *Tbr1*^{+/-} ha llevado a cuestionar la posibilidad propuesta inicialmente sobre la disfunción de la subplaca como mecanismo patogénico en algunos tipos de autismo (Huang y Hsueh, 2015).

2. Efectos de la sobreexpresión de DYRK1A en la composición neuronal de la corteza cerebral

La organización de las unidades funcionales que forman los circuitos neuronales y la integración de los estímulos excitadores e inhibidores a nivel de una neurona son fundamentales para el procesamiento de la información que media la función cerebral. La relación entre sinapsis excitadoras e inhibidoras es un factor crítico para el establecimiento y mantenimiento de los circuitos neuronales. De hecho, numerosas evidencias indican que cambios en la relación excitación/inhibición son comunes en distintos trastornos del neurodesarrollo. Estos trastornos incluyen síndromes de DI como el SD y el síndrome de X frágil, la esquizofrenia y el autismo (Gatto y Broadie, 2010; Marín, 2012; Penzes y col., 2013; Rubenstein, 2010).

Estudios realizados en modelos de ratón de SD, principalmente en el modelo Ts65Dn, sugieren que los defectos cognitivos en el SD son debidos a un exceso de inhibición. La corteza cerebral de los ratones Ts65Dn tiene un déficit de sinapsis excitadoras (Belichenko y col., 2004; Kurt y col., 2000) y un aumento relativo de marcadores de sinapsis inhibidoras (Belichenko y col., 2009b). A nivel funcional, se ha observado que la inhibición mediada por GABA impide la inducción de LTP en el hipocampo de los ratones Ts65Dn (Belichenko y col., 2004; Kleschevnikov y col., 2004; Siarey y col., 1999). Además, el tratamiento crónico de estos ratones con antagonistas de receptores GABA_A a dosis no epileptogénicas causa la recuperación persistente de la LTP y una mejora significativa en la realización de pruebas cognitivas que son hipocampo-dependientes (Fernández y col., 2007), resultados que apoyaban la teoría del exceso de inhibición GABAérgica en el SD.

Como se ha comentado anteriormente, las neuronas excitadoras e inhibidoras de la neocorteza adulta se generan durante el desarrollo embrionario en el telencéfalo dorsal y ventral respectivamente (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009; Welagen y Anderson, 2011). La neurogénesis en el telencéfalo dorsal de los embriones Ts65Dn empieza más tarde que en los embriones euploides causando un déficit de neuronas excitadoras que se mantiene hasta etapas del desarrollo post-natal, cuando las neuronas se diferencian y establecen conexiones sinápticas (Chakrabarti y col., 2007). Además, en los embriones Ts65Dn hay una hiper-proliferación de los precursores del telencéfalo ventral que resulta en un incremento de los principales subtipos de neuronas GABAérgicas inhibidoras de la neocorteza e hipocampo (Chakrabarti y col., 2010). Los autores de estos trabajos han postulado que el déficit de neuronas excitadoras conjuntamente con el exceso de neuronas inhibidoras alteran la formación de la circuitería cerebral contribuyendo así a la sobre-

inhibición observada en los ratones Ts65Dn. Estos autores demostraron que el exceso de neuronas inhibitoras en estos ratones es debido a la trisomía de los genes del HSA21 *Olig1* y *Olig2* ya que la normalización de la dosis de estos dos genes en el ratón Ts65Dn rescató el fenotipo (Chakrabarti y col., 2010). Por otro lado, como ya hemos comentado, el estudio realizado en nuestro laboratorio durante el desarrollo de la corteza cerebral de los modelos mBACTg*Dyrk1a* y Ts65Dn demostró que la trisomía del gen *Dyrk1a* es la responsable del retraso del inicio de la neurogénesis observado en el telencéfalo dorsal de los embriones Ts65Dn. Este estudio también puso en evidencia que la sobre-expresión de DYRK1A altera toda la corticogénesis afectando no solo la generación de neuronas excitadoras de la capa VI sino también la de las capas II-III (Najas y col., 2015).

Estudios previos a este trabajo habían demostrado que la CSS de los ratones adultos mBACTg*Dyrk1a* tienen una menor densidad de neuronas que los ratones de genotipos control (Guedj y col., 2012). En concordancia con este resultados y con los publicados por Najas y colaboradores (2015), las cuantificaciones de neuronas que expresan NeuN (un marcador de neuronas excitadoras que marca parte de las inhibitoras) reveló que los animales mBACTg*Dyrk1a* jóvenes (2 meses de edad) tienen menos neuronas en la neocorteza, tanto en las capas bajas (capas IV-VI) como en las altas (capas II-III). El doble inmunomarcaje con NeuN y GABA, demostró que la alteración en el número de neuronas NeuN+ en los transgénicos que sobre-expresan DYRK1A se debe, principalmente, a un déficit de neuronas excitadoras (Fig. 23). Este resultado confirma que la trisomía del gen *Dyrk1a* tienen un efecto deletéreo en la formación y mantenimiento de los circuitos corticales del ratón Ts65Dn que podrían resultar en una menor excitabilidad cerebral.

Estudios morfológicos pioneros realizados en tejido *post-mortem*, revelaron que las neuronas piramidales (neuronas excitadoras) de la neocorteza de niños y adultos con SD presentan un árbol dendrítico menos complejo y con menos espinas que las neuronas euploides (Marín-Padilla, 1976; Takashima y col., 1989). Alteraciones similares se han observado al analizar el árbol dendrítico de neuronas piramidales de la corteza frontal del ratón Ts65Dn (Dierssen y col., 2003). El análisis morfológico de las dendritas oblicuas de las neuronas excitadoras de las capas V y VI de la corteza pre-frontal realizado en ratones mBACTg*Dyrk1a* adultos evidenció un exceso muy significativo en la densidad de espinas. Sin embargo, la morfología de estas espinas parece no estar alterada. El incremento de espinas en los ratones mBACTg*Dyrk1a* correlaciona con un aumento en los niveles de la proteína de andamiaje post-sináptica PSD95 en extractos de la corteza pre-frontal y con un aumento en la amplitud de las corrientes post-sinápticas excitadoras miniatura (mEPSCs). Sin embargo, la frecuencia de los mEPSCs en los ratones transgénicos es muy similar a la de los controles, indicando que muchas de las espinas que hay en las dendritas de las

neuronas piramidales mBACTg*Dyrk1a* no establecen sinapsis funcionales (Thomazeau y col., 2014). En otro modelo de ratón transgénico que sobre-expresa niveles moderados de la proteína DYRK1A en cerebro, el ratón Tg*Dyrk1A* (Altafaj y col., 2001), se ha descrito que las dendritas basales de las neuronas excitadoras de la capa III de la corteza motora adulta presentan un déficit de espinas y, además, éstas son más cortas que las espinas de las dendritas de los ratones control (Martínez de Lagran y col., 2012). La aparente discrepancia en el fenotipo de las espinas de los ratones mBACTg*Dyrk1a* y Tg*Dyrk1A* puede ser debida a las distintas capas o áreas de la corteza estudiadas (capas profundas en la corteza prefrontal frente a capas superficiales en la corteza motora), al tipo de dendritas analizado (oblicuas frente a basales) o, a las diferencias en el promotor que dirige la sobre-expresión de DYRK1A (endógeno en el mBACTg*Dyrk1a* frente a exógeno en el Tg*Dyrk1A*). En los ratones Tg*Dyrk1A* se analizó también la morfología del árbol dendrítico observándose alteraciones estructurales muy similares a las del ratón Ts65Dn (Martínez de Lagran y col., 2012). Estos resultados en su conjunto indican que la sobre-expresión de DYRK1A altera la densidad de espinas y la complejidad del árbol dendrítico de las neuronas piramidales de la corteza adulta, alteración que podría contribuir a los déficits cognitivos asociados al SD.

En relación a las neuronas inhibitoras, nuestros resultados indican que los ratones mBACTg*Dyrk1a* de 2 meses de edad tienen un número de neuronas inhibitoras (GABA+) en las capas externas e internas de la CSS semejante al de los controles de camada (Fig. 23). Estos resultados contrastan con el incremento de neuronas que expresan GAD67 (una de las 2 enzimas que cataliza la descarboxilación del glutamato para formar GABA) observado en la corteza pre-límbica de otro modelo de sobre-expresión de DYRK1A, el ratón hYACTg*Dyrk1a* (Souchet y col., 2014). Este ratón, inicialmente denominado TgYAC152F7 (Smith y col., 1997), tiene un fragmento de HSA21 que contiene *DYRK1A* y otros 4 genes de la región crítica del SD. Por tanto, es posible que el efecto de la expresión de 5 genes humanos sea distinto a la expresión de una copia adicional del gen *Dyrk1a* de ratón. También es posible que los efectos de la sobre-expresión de DYRK1A sobre el contenido de neuronas GABAérgicas sea región-específico. Esta posibilidad está apoyada por resultados del laboratorio todavía sin publicar que indican que los efectos de DYRK1A sobre la proliferación/diferenciación de los precursores neurales es tipo-específico.

Estudios del laboratorio realizados en la CSS de animales mBACTg*Dyrk1a* de 2 meses de edad pusieron de manifiesto alteraciones en el número de neuronas inhibitoras de los 3 subtipos examinados; las neuronas PV+, las SST+ y las CR+. Estos 3 subtipos de neuronas representan casi el 90% de las neuronas inhibitoras de la neocorteza del ratón, siendo el porcentaje de células PV+ el 40% aproximadamente (ver Fig. 4; Sultan y col., 2015). En los ratones mBACTg*Dyrk1a* se detectó un déficit de neuronas PV+ y un

incremento de neuronas SST+ y de neuronas CR+ (Najas, 2014). Estas diferencias explicarían que el número de neuronas totales que expresan GABA sea semejante en la CSS de los ratones mBACTg*Dyrk1a* y controles.

Los recuentos realizados en este trabajo en ratones mBACTg*Dyrk1a* de 2 semanas de edad mostraron diferencias en el contenido de interneuronas PV+, SST+ y CR+ del mismo sentido y magnitud a las observadas por Najas (2014) en animales adultos. Estos resultados sugieren que la sobre-expresión de DYRK1A afecta la generación y/o migración de estos sub-tipos de inter-neuronas. Las neuronas PV+ y SST+ se generan en la eminencia ganglionar medial en dominios temporales parcialmente solapantes (Wonders y col., 2008). Estudios recientes indican que las neuronas SST+, que tienden a generarse antes que las PV+, se producen predominantemente a partir de progenitores que se dividen en la superficie ventricular, mientras que las PV+ lo hacen a partir de progenitores que se dividen en la zona subventricular (Petros y col., 2015). Resultados preliminares del laboratorio sugieren que en la EGM de los embriones mBACTg*Dyrk1a* hay un sesgo en la proporción de estos dos tipos de progenitores a favor de los progenitores que generan neuronas SST+. Estos datos correlacionan con resultados de experimentos de incorporación de BrdU que muestran una mayor producción de neuronas SST+ y menor producción de neuronas PV+ en la EGM de los embriones mBACTg*Dyrk1a* respecto a los embriones controles (Najas, 2014). Estas diferencias explican los resultados de las cuantificaciones de neuronas inhibitoras realizados en la CSS de ratones postnatales mBACTg*Dyrk1a* y descartan la posibilidad de un defecto relevante en la migración tangencial (migración desde la eminencia ganglionar medial hasta la neocorteza) de las neuronas PV+ y SST+ en el modelo mBACTg*Dyrk1a*.

Las neuronas inhibitoras PV+ y SST+ del hipocampo y la neocorteza presentan características diferentes en cuanto al control del tiempo y la velocidad y descarga de los potenciales de acción (Atallah y col., 2012; Royer y col., 2012; Wilson y col., 2012) (Fig. 4). Las neuronas PV+, que contactan con el soma o el segmento inicial del axón de las neuronas excitadoras, son la principal subpoblación de interneuronas responsable de los ritmos theta que sincronizan la circuitería cortical (Wulff y col., 2009) y, de la generación de los ritmos gamma que potencian la transmisión de las señales en la neocorteza (Sohal y col., 2009). Por el contrario, las neuronas SST+ contactan con las dendritas de las neuronas excitadoras corticales y muestran actividad espontánea que provee de inhibición tónica a estas neuronas (Gentet y col., 2012). Las neuronas SST+ también median la inhibición entre las neuronas piramidales colindantes, recibiendo sinapsis de las neuronas excitadoras adyacentes y formando sinapsis inhibitoras en las dendritas distales de éstas. Este hecho permite la inhibición dependiente de la actividad de las neuronas excitadoras vecinas y ha

sido propuesto como uno de los mecanismos centrales de la regulación de la actividad cortical (Berger y col., 2009; Silberberg y Markram, 2007). Además, tal y como se describió en el apartado anterior, la alteración de estos dos subtipos de neuronas inhibitoras durante el desarrollo post-natal podría tener un efecto en la excitabilidad de los circuitos corteza-tálamo (Tuncdemir y col., 2016). Todas estas diferencias indican que el exceso de neuronas SST+ junto con el déficit de neuronas PV+ observado en este trabajo y en trabajos anteriores del grupo (Najas, 2014) puede tener un efecto deletéreo en el establecimiento y mantenimiento de la actividad cortical.

En la corteza de los ratones Ts65Dn hay un incremento significativo tanto de neuronas SST+ como de neuronas PV+ que resulta de una mayor proliferación en la eminencia ganglionar medial. Los experimentos de rescate genético mencionados anteriormente demostraron que la sobre-expresión de *Olig1* y *Olig2* es suficiente para explicar este fenotipo (Chakrabarti y col., 2010). Sin embargo, el hecho de que los embriones con 3 copias funcionales del gen *Dyrk1a* altere la proporción de progenitores que generan neuronas PV+ y SST+, sugiere la posibilidad de que la sobre-expresión de DYRK1A esté modulando el efecto hiper-proliferativo de la sobre-expresión de Olig 1 y Olig2 en la eminencia ganglionar medial de los embriones Ts65Dn.

Además de las alteraciones estructurales y funcionales mencionadas, la neocorteza e hipocampo de los ratones mBACTg*Dyrk1a* presentan niveles reducidos de proteínas implicadas en la neurotransmisión glutamatérgica, como son el VGLUT1 o las subunidades NR1 y NR2A de los receptores de NMDA, y niveles aumentados de proteínas implicadas en la neurotransmisión GABAérgica como el VGAT1 o la encima GAD67 (Souchet y col., 2014). En este mismo estudio se demostró que la mayoría de las proteínas glutamatérgicas y GABAérgicas con niveles alterados en los ratones mBACTg*Dyrk1a* cambian en el mismo sentido en la neocorteza e hipocampo de los ratones Ts65Dn. Además, se ha publicado que la normalización de la dosis génica de *Dyrk1a* en los ratones Ts65Dn aumenta los niveles de VGLUT y disminuye los de GAD65/67 en el hipocampo aunque éstos no llegan a alcanzar los del hipocampo euploide (García-Cerro y col., 2014). Estos resultados en su conjunto apoyan la hipótesis de que la sobre-expresión de DYRK1A contribuye al exceso de inhibición GABAérgica en el ratón Ts65Dn.

Los estudios funcionales realizados en distintos modelos de ratón que sobre-expresan DYRK1A y en el modelo Ts65Dn sugieren que uno de los genes del cromosoma HSA21 candidatos para explicar los defectos cognitivos asociados al SD es *DYRK1A* (Haydar y Reeves, 2012). Los siguientes resultados apoyan esta posibilidad. Por un lado, se ha visto que los ratones mBACTg*Dyrk1a* muestran alteraciones en pruebas conductuales

que evalúan aprendizaje y memoria (Souchet y col., 2014) y presentan alteraciones importantes en la LTP mediada por NMDA en la corteza pre-frontal (Thomazeau y col., 2014). Por otro lado, la normalización de la dosis génica de *Dyrk1a* en el ratón Ts65Dn mejora significativamente su memoria de trabajo y de referencia y rescata completamente la LTP en rodajas de hipocampo (García-Cerro y col., 2014).

Los recuentos de neuronas realizados en la corteza cerebral del modelo del ratón mBACTg*Dyrk1a* y los datos de la literatura comentados en esta sección, indican que la sobre-expresión de DYRK1A altera el balance de estímulos excitadores/inhibidores de la corteza cerebral y que este desequilibrio podría contribuir a los déficits cognitivos asociados al SD.

3. Alteraciones de la citoarquitectura y función cerebral en el modelo de discapacidad intelectual asociada a mutaciones en el gen *DYRK1A*

En el modelo de haploinsuficiencia del gen *Dyrk1a* hemos observado también un desequilibrio entre el número de neuronas excitadoras/inhedoras de la corteza cerebral. Comentaremos cómo este desequilibrio podría afectar a la conectividad sináptica de esta estructura del cerebro y contribuir a algunos de los defectos funcionales que son característicos en pacientes con DI y autismo causada por mutaciones dominantes en el gen *DYRK1A*.

3.1. Alteraciones morfológicas

Durante el desarrollo postnatal, coincidiendo con el inicio de la sinaptogénesis (P7), los ratones *Dyrk1a*^{+/-} muestran una neocorteza más fina que la de los ratones controles debido a una disminución del grosor de las capas altas (II-IV) y bajas (V-VI) (Fig. 18). También hemos observado que la haploinsuficiencia de *Dyrk1a* no afecta homogéneamente a todas las capas. Así por ejemplo, se ha visto que la capa V de la neocorteza *Dyrk1a*^{+/-} es significativamente más fina que la de los controles mientras que la capa VI tiene un grosor ligeramente superior (datos sin publicar del laboratorio). Los ratones P7 *Dyrk1a*^{+/-} muestran también un incremento de neuronas tanto en las capas altas como en las bajas (Fig.18). Este incremento correlaciona con un incremento de neuronas en las capas II-IV que expresan el marcador de capa Mef2c (Fig. 20) y con un incremento de neuronas en la capa VI que expresan el marcador de capa Tbr1 (Najas y col., 2015). Sin embargo, los ratones *Dyrk1a*^{+/-} tienen menos neuronas que expresan el marcador Ctip2 en la capa V (Fig. 19). Los ratones P7 mBACTg*Dyrk1a* muestran un fenotipo prácticamente opuesto al de los ratones *Dyrk1a*^{+/-}: tienen menos neuronas Mef2c y Tbr1 e igual número de neuronas Ctip2 (Najas y col., 2015). Estudios del laboratorio realizados durante el desarrollo embrionario del telencéfalo dorsal del modelo de sobre-expresión mBACTg*Dyrk1a*, indican que el déficit de neuronas Tbr1 en este modelo se debe como ya hemos mencionado a que la glía radial durante la primera etapa de la neurogénesis genera menos neuronas que en los embriones control que es debido a un desequilibrio en la relación de divisiones asimétricas proliferativas, que generan progenitores intermedios, y las divisiones asimétricas neurogénicas, que generan neuronas. En consecuencia, el número de progenitores intermedios aumenta más rápidamente que en los embriones control compensando así el déficit inicial de neuronas en estadios intermedios de la corticogénesis. Sin embargo, el pool

de progenitores intermedios en los embriones mBACTg*Dyrk1a* disminuye drásticamente al final de la corticogénesis, explicando así el déficit de neuronas que expresa el marcador de neuronas de capas altas Mef2c en la neocorteza postnatal de los animales mBACTg*Dyrk1a* (Najas y col., 2015). Al contrario de lo que ocurre durante el inicio de la corticogénesis en los embriones mBACTg*Dyrk1a*, en los *Dyrk1a*^{+/-} se generan más neuronas y menos progenitores intermedios, lo que explica el exceso de neuronas Tbr1+ observado en el modelo *Dyrk1a*^{+/-} cuando la neurogénesis cortical ha concluido (Najas y col. 2015). El defecto en la producción inicial de progenitores intermedios concuerda también con que los ratones P7 *Dyrk1a*^{+/-} tengan menos neuronas Citp2+ en la capa V que los controles (Fig. 17). Sin embargo no explica que la densidad neuronal en esta capa y en las capas más altas (II-IV) sea mayor en los animales *Dyrk1a*^{+/-} que en los controles. Aunque no se ha demostrado experimentalmente, es posible que los progenitores intermedios *Dyrk1a*^{+/-} realicen más divisiones proliferativas que los controles. Esta posibilidad está de acuerdo con recuentos de progenitores intermedios (Tbr2+) realizados a E13,5 en el laboratorio en los que se observa un ligero aumento en el número de estos progenitores en la zona subventricular de los embriones *Dyrk1a*^{+/-} (Sònia Najas, resultados sin publicar).

El número de neuronas que forma una estructura está determinado por el balance entre la proliferación neuronal y la muerte celular programada. La muerte celular programada en la neocorteza en desarrollo se inicia en estadios embrionarios tempranos, asociada principalmente a progenitores, y finaliza en estadios postnatales, cuando la sinaptogénesis se está produciendo, contribuyendo así al refinamiento de las neuronas que integran la circuitería cerebral (Haydar y col., 1999). Estudios realizados en la retina y en el mesencéfalo ventral de los ratones mBACTg*Dyrk1a* y *Dyrk1a*^{+/-} han mostrado que la proteína quinasa DYRK1A inhibe de manera dosis-dependiente la apoptosis fisiológica mediada por la vía intrínseca de muerte celular programada en ciertos tipos de neuronas de la retina y del mesencéfalo ventral. En consecuencia, los animales mBACTg*Dyrk1a* tienen más neuronas después del periodo de muerte celular programada en estas dos estructuras y los *Dyrk1a*^{+/-} tienen menos (Laguna y col., 2008, 2013; Barallobre y col. 2014). Sin embargo, la neocorteza de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} presenta más neuronas tanto a P7 como a 2 meses de edad (Fig. 23), indicado que la haploinsuficiencia de *Dyrk1a* no incrementa significativamente la muerte fisiológica de las neuronas de la neocorteza. El recuento de células que expresan la forma activa de la Caspasa-3 realizado en embriones mBACTg*Dyrk1a* y controles sugieren que la sobreexpresión moderada de DYRK1A tampoco altera de forma importante la muerte fisiológica de la corteza en desarrollo.

Al contrario de lo que ocurre en los mutantes mBACTg*Dyrk1a* a P14, el número de neuronas inhibitoras SST+ y PV+ en los ratones *Dyrk1a*^{+/-} en este estadio del desarrollo es

muy similar al de los ratones *Dyrk1a^{+/+}*. Esto sugiere que la neurogénesis en la eminencia ganglionar medial de los embriones *Dyrk1a^{+/-}* no está significativamente alterada. Sin embargo, sí observamos un déficit de neuronas CR+ en las capas altas de la neocorteza de los ratones *Dyrk1a^{+/-}* postnatales (Fig. 22). El contenido de los cinco subtipos de neuronas inhibitoras examinados, incluyendo el que expresa CR, en los ratones *Dyrk1a^{+/-}* de dos meses de edad no es significativamente distinto al de los animales control (Fig. 25). Alrededor del 50% de las neuronas inhibitoras de la neocorteza que se generan mueren durante los primeros quince días después del nacimiento, siendo el pico máximo de muerte alrededor de P7 (Ferrer y col., 1992; Miller y col., 1995; Blaschke y col., 1996). Por tanto, el hecho de que la CSS de los ratones *Dyrk1a^{+/-}* a P14 tengan menos neuronas CR+ que los ratones controles pero números semejantes en ambos genotipos a los dos meses de edad se podría explicar por un adelanto en la ventana de tiempo en que mueren este subtipo de interneuronas en los mutantes *Dyrk1a* haploinsuficientes.

A pesar de que no se han observado cambios significativos en ninguno de los cinco subtipos de neuronas inhibitoras examinadas en los animales *Dyrk1a^{+/-}* de dos meses de edad, sí hemos observado un aumento del 30% aproximadamente en las neuronas inhibitoras (GABA+) en las capas V-VI en estos ratones. Este resultado aparentemente contradictorio podría explicarse por un pequeño aumento en el número de distintos tipos de interneuronas en estas capas. También se podría explicar por un aumento en algún subtipo de interneurona no examinado. Uno de ellos podría ser las neuronas que expresan Relina. En condiciones fisiológicas este subtipo de neuronas inhibitoras se sitúan en las capas altas de la neocorteza (Miyoshi y col., 2010). Dado que la posición final de las neuronas inhibitoras depende en gran medida de la identidad de las neuronas excitadoras que hay en cada capa (Lodato y col., 2011), podríamos especular que los cambios en la densidad de neuronas excitadoras y expresión de marcadores de capa (identidad) observada en la neocorteza postnatal *Dyrk1a^{+/-}* podría alterar no solo el número si no también la distribución por capas de las neuronas Relina+.

Los recuentos de sinapsis realizados en las capas IV y VI de la CSS de los ratones *Dyrk1a^{+/-}* adultos muestran un incremento de la densidad de sinapsis excitadoras (Fig. 31A). Este incremento correlaciona con la mayor densidad de neuronas excitadoras observada en todas las capas de la neocorteza de los mutantes *Dyrk1a^{+/-}*. Sin embargo, resultados previos habían demostrado que las dendritas de las neuronas excitadoras de la corteza motora adulta *Dyrk1a^{+/-}* son más cortas y tienen una menor densidad de espinas que las neuronas de la corteza *Dyrk1a^{+/+}*. También se observó que las neuronas analizadas tenían un árbol dendrítico menor y menos complejo que las neuronas de los ratones control (Benavides-Piccione y col., 2005). Los datos obtenidos en este estudio sugieren que las neuronas

excitadoras de la corteza *Dyrk1a*^{+/-} tienen menos sinapsis excitadoras axón-dendrita por neurona que las neuronas control. Nuestros resultados junto con los publicados por Benavides-Piccione y colaboradores (2005), indican que el incremento de sinapsis excitadoras observado en las capas IV y VI de la neocorteza *Dyrk1a*^{+/-} se debe, principalmente, a la mayor compactación de las neuronas. Estos dos estudios se han analizado áreas de la corteza distintas; capas II-III de la neocorteza motora en el estudio de Benavides-Piccione y colaboradores (2005) y, capas IV y VI de la CSS en este estudio. Por tanto, existe la posibilidad de que el fenotipo de espinas/sinapsis excitadoras en los ratones *Dyrk1a*^{+/-} sea región/capa específico. En este sentido, sería interesante analizar el fenotipo de las dendritas en las neuronas piramidales de la región analizada en este estudio y correlacionar los resultados morfológicos con estudios de electrofisiología.

A pesar del incremento de neuronas GABAérgicas observado en las capas V-VI de los ratones *Dyrk1a*^{+/-}, la densidad de sinapsis inhibitoras en los ratones mutantes es muy semejante a la de los ratones controles tanto en la capa IV como en la VI (Fig. 31B). Teniendo en cuenta que los ratones *Dyrk1a*^{+/-} tienen una mayor densidad de neuronas excitadoras en todas las capas de la neocorteza, los recuentos de sinapsis inhibitoras indican que las neuronas excitadoras de la neocorteza *Dyrk1a*^{+/-} adulta están menos inhibidas que en la neocorteza *Dyrk1a*^{+/+}.

Los recuentos de neuronas y sinapsis comentados sugieren que la neocorteza de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} tiene un exceso neuronas excitadoras y que estas neuronas están menos inhibidas que en los ratones controles. Los recuentos de subtipos de neuronas inhibitoras realizados en las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo de ratones adultos *Dyrk1a*^{+/+} y *Dyrk1a*^{+/-}, mostró alteraciones en la densidad de todos los subtipos de neuronas analizado (PV+, SST+, CR+, NPY+ y VIP+) al menos en una de las tres regiones del hipocampo *Dyrk1a*^{+/-} (Figs. 26-30). Los cambios de densidades observados son distintos según el subtipo de neurona y la región del hipocampo. Así por ejemplo, la región CA1 y CA3 de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} tienen una mayor densidad de neuronas PV+ y SST+, el GD de estos ratones tiene menos neuronas NPY+ y VIP+ y más neuronas CR+. La densidad de neuronas inhibitoras no tiene una correlación directa con la actividad neuronal. Así por ejemplo, las neuronas VIP+ inhiben la actividad inhibitora de otros subtipos de interneuronas, principalmente las SST+, desinhibiendo a las neuronas excitadoras (Tremblay y col., 2016). Por consiguiente el incremento de neuronas VIP+ observado en el GD de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} podría resultar en una hiper-activación de las neuronas granulares.

Además de los defectos en el contenido de neuronas inhibitoras, el hipocampo de los ratones *Dyrk1a* haploinsuficientes presentan otras alteraciones estructurales relevantes. Los ratones adultos jóvenes *Dyrk1a*^{+/-} tienen un hipocampo significativamente más pequeño que los controles. Este defecto es muy evidente en el GD y en la región CA1 pero no en la región CA3 (ver como ejemplo la Fig. 28) que tiene un volumen semejante al de la región CA3 de los ratones controles. La capa piramidal de la CA1 y la capa granular del GD, que están formadas por las somas de neuronas excitadoras, en los ratones *Dyrk1a*^{+/-} tienen un grosor normal (datos del laboratorio sin publicar). Estas observaciones indican que la región CA1 y GD de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} tienen menos neuronas excitadoras que los ratones controles. Las regiones CA1, CA3 y GD de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} envejecidos (24 meses de edad) presentan una marcada disminución de tamaño y la capa piramidal de la CA3 y la capa de células granulares son significativamente más finas en estos ratones que en los ratones controles de la misma edad (Arqué y col., 2009). Las diferencias de volumen y celularidad del hipocampo entre ratones *Dyrk1a*^{+/-} jóvenes (2-3 de edad) y envejecidos, indican que parte del déficit de neuronas observado en los ratones *Dyrk1a*^{+/-} envejecidos es debido a un proceso de neurodegeneración prematura.

El *stratum radiatum* está compuesto por las dendritas apicales de las neuronas piramidales y por interneuronas. La densidad de sinapsis inhibitoras en el *stratum radiatum* de la CA1 de los ratones controles es mayor en la subregión dorsal (más próxima al soma de las neuronas piramidales) que en la subregión más ventral. A pesar de las diferencias en densidad de neuronas SST+ y CR+ observada en la región CA1 de los ratones *Dyrk1a*^{+/-}, las densidades de sinapsis inhibitoras en estos ratones son semejantes a los controles en las dos subregiones del *stratum radiatum* analizadas (Fig. 32A). Sin embargo, no podemos descartar con nuestros resultados que no haya diferencias entre genotipos en el tipo de sinapsis y sitio de contacto de las mismas. Al contrario de lo que ocurre con las sinapsis inhibitoras, la subregión dorsal del *stratum radiatum* de los ratones controles tiene menos sinapsis excitadoras que la subregión ventral. Esta observación está de acuerdo con el hecho de que regiones más distales de las dendritas tienden a tener más espinas que las regiones más próximas al soma (Spruston, 2008). Este gradiente dorso-ventral no se observa en los ratones *Dyrk1a*^{+/-} que presentan densidades de sinapsis excitadoras muy similares en las dos subregiones del *stratum radiatum* (Fig. 32B).

Este fenotipo podría indicar alteraciones en la morfología del árbol dendrítico y/o en la distribución de las espinas. Esta posibilidad está de acuerdo con la función en dendritogénesis asignada a DYRK1A (Martínez de Lagran y col., 2012) y con el fenotipo de las dendritas de neuronas piramidales de la corteza *Dyrk1a*^{+/-} descrito en Benavides-Piccione y colaboradores (2005).

En su conjunto, las alteraciones morfológicas de la neocorteza e hipocampo de los ratones *Dyrk1a* haploinsuficientes podrían tener un efecto deletéreo en la coordinación espacio-temporal de los circuitos corticales. Como hemos comentado en la sección anterior, múltiples evidencias indican que un desequilibrio en la excitación/inhibición de los circuitos corticales puede causar DI, autismo y epilepsia (Marín, 2012). Los ratones *Dyrk1a*^{+/-} presentan defectos de memoria y aprendizaje (Arqué y col., 2009; Arqué y col., 2008) y, como comentaremos más adelante, muestran actividad epiléptica y un comportamiento autista. Por tanto, es posible que las alteraciones morfológicas aquí descritas contribuyan a la DI y otros efectos neurológicos que son comunes en los pacientes con mutaciones *de novo* en el gen *DYRK1A*.

3.2. Alteraciones funcionales

Los pacientes descritos con mutaciones *de novo* en el gen *DYRK1A* presentan TEA. Además, se ha reportado actividad epiléptica con ataques atónicos y convulsiones mioclónicas generalizadas en un 50% de estos pacientes (van Bon y col., 2015a; Luco y col., 2016). La epilepsia y el TEA son fenotipos comunes en otros síndrome de DI con distinta etiología y causa genética, como el síndrome de Rett y el síndrome de X-Frágil (Bozzi y col., 2012 ; Brooks-Kayal, 2010; Tuchman y col., 2010).

A partir de los 3-4 meses de edad, los ratones *Dyrk1a*^{+/-} presentan convulsiones espontáneas en condiciones de estabulación estándares. En colaboración con la Dra. Marina Sánchez (Fundación Jiménez Díaz, Madrid) se han obtenido registros encefalográficos (EEGs) en animales *Dyrk1a*^{+/-} adultos en los que se mantuvo libertad de movimiento y acceso a comida y agua *ad libitum*. Los registros realizados en un aparato acoplado a una videocámara mostraron la presencia de crisis tónico-clónicas generalizadas con actividad de punta-onda en los ratones *Dyrk1a*^{+/-}. Además, los registros de estos ratones mostraron mioclonías con presencia de poli-puntas y punta-onda que son indicativas de actividad epiléptica (resultados sin publicar mostrados en la Fig. 37). Esta actividad epiléptica correlaciona con un aumento de células que expresan el marcador de actividad neuronal c-Fos en la región CA3 del hipocampo de ratones *Dyrk1a*^{+/-} de 4-6 meses de edad mantenidos en condiciones de estabulación estándar (Fig. 33). Este resultado sugiere que las alteraciones estructurales observadas en el hipocampo de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} pueden desencadenar o contribuir al fenotipo epiléptico que muestran estos ratones. El hecho de que las crisis tónico-clónicas registradas en los mutantes *Dyrk1a* sean generalizadas (afectan a los dos hemisferios) apoyan la hipótesis de una desincronización generalizada de

los circuitos corticales. Las alteraciones descritas en el apartado anterior en la proporción de distintos subtipos de neuronas excitadoras e inhibitoras podrían contribuir a la desincronización cortical, como ocurre en el ratón knockout de *Cntnap2* (Peñagarikano y col., 2011).

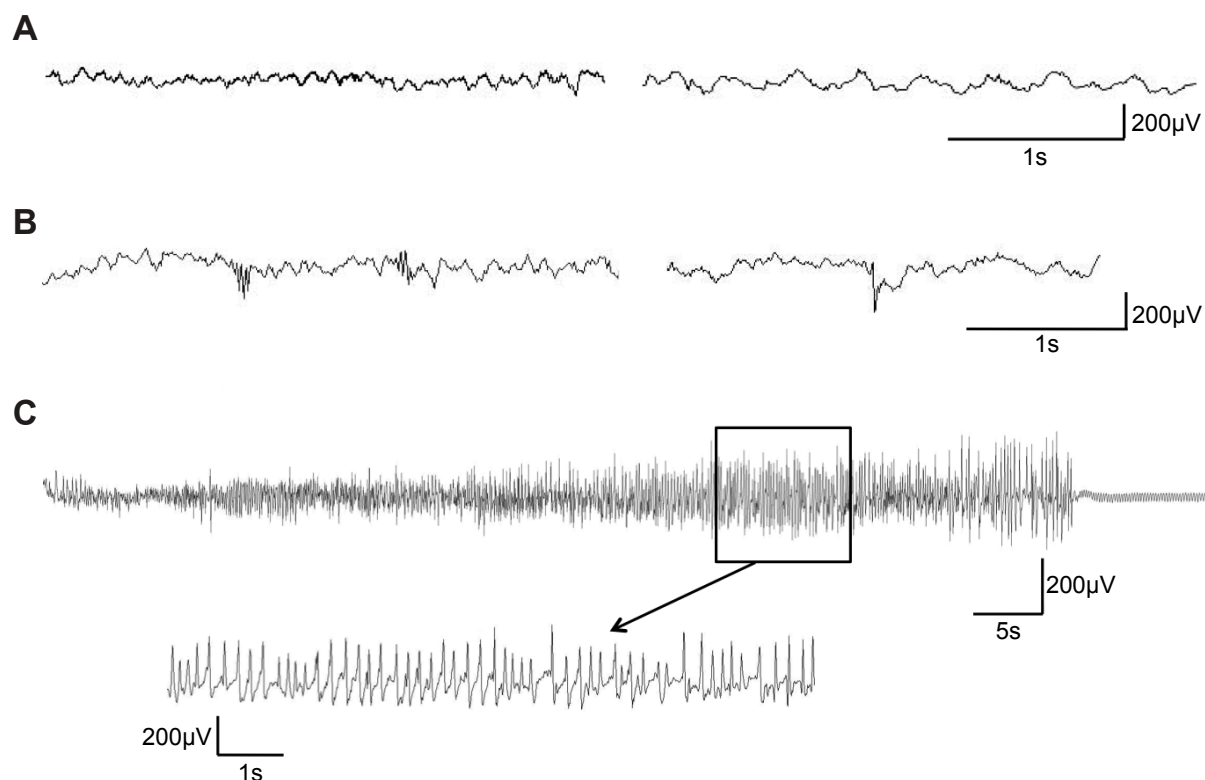


Figura 37. Alteraciones en los registros electroencefalográficos (EEGs) de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} adultos. (A) Los EEGs muestran la actividad basal de un ratón *Dyrk1a*^{+/+} (registro en la izquierda) y la de un ratón *Dyrk1a*^{+/-} (registro en la derecha). El registro del ratón *Dyrk1a*^{+/+} tiene una frecuencia de 9-12 Hz (ritmo alfa) mientras que la frecuencia en el registro del ratón *Dyrk1a*^{+/-} es de 3 a 4 Hz (ritmo delta). Esta frecuencia es semejante a la de un ratón *Dyrk1a*^{+/+} durante el sueño. (B) EEGs de ratones *Dyrk1a*^{+/-} con mioclonias. En el registro de la izquierda se observa poli-puntas y en el de la derecha una punta-onda entre crisis. (C) Representación de una crisis tónico-clónica generalizada de 74 s de duración registrada en un ratón *Dyrk1a*^{+/-}. El recuadro es una ampliación de un tramo de 10 s, frecuencia 4 Hz, donde se muestra la actividad de punta-onda.

El TEA es un trastorno del neurodesarrollo con muchos genes y regiones cromosómicas implicadas que se caracteriza por la presencia de alteraciones en la interacción social, déficits en la comunicación y movimientos repetitivos y/o estereotipados (Abrahams y Geschwind, 2008). Este tipo de conductas alteradas se pueden estudiar en el ratón realizando pruebas conductuales específicas que han sido validadas en diversos modelos de TEA (Silverman y col., 2010). En este trabajo, hemos utilizado dos de estas

pruebas: la prueba de interacción social “residente-intruso” y la prueba de las canicas enterradas, para evaluar el posible comportamiento autista de los ratones *Dyrk1a*^{+/-}. En los dos tipos de pruebas los ratones *Dyrk1a*^{+/-} mostraron movimientos estereotipados mucho más frecuentemente y de mayor duración que los animales controles (Figs. 35, 36). Al contrario de los ratones controles, los ratones *Dyrk1a*^{+/-} realizaron más enterramientos en la zona de la jaula libre de canicas que en la zona de las canicas. Esta conducta repetitiva, podría ser consecuencia de una menor capacidad exploratoria ante un objeto novedoso, en este caso las canicas. Una reducción en la capacidad exploratoria de estos mutantes se observó también en la prueba del reconocimiento de objetos novedosos (del inglés, *novel object recognition*; Arqué y col., 2008), donde los ratones *Dyrk1a*^{+/-} adultos mostraron tiempos de exploración similares con el objeto novedoso y con el familiar.

Las conductas repetitivas se pueden evaluar en otras pruebas frecuentemente utilizadas en estudios conductuales en ratón como son, la prueba del campo abierto y la del laberinto en cruz elevado. En la prueba del campo abierto, los animales *Dyrk1a*^{+/-} permanecen mucho menos tiempo en el centro del campo que los ratones controles. Esta conducta se debe a la marcada hipo-actividad y al comportamiento ansioso de estos mutantes (Fotaki y col., 2004). La prueba de las canicas enterradas se realiza en una jaula convencional que tiene dimensiones significativamente menores a las del campo abierto. Por tanto, no se espera que la hipo-actividad y fenotipo ansioso de los ratones *Dyrk1a*^{+/-} interfiera en la ejecución de la prueba. De hecho, se han observado diferencias muy significativas en la ejecución de la prueba de las canicas enterradas entre ratones de distintas cepas (distinto acervo genético) que no correlacionan con comportamientos ansiosos (Thomas y col., 2009). Otros modelos de autismo que muestran, al igual que el ratón *Dyrk1a*^{+/-} (Fig. 34), una disminución significativa de canicas enterradas en esta prueba son: el ratón *ephrin-A2*^{-/-}*A3*^{-/-} (Wurzman y col., 2015), el ratón *Cntap2*^{-/-} (Peñagarikano y col., 2011) y, el ratón *Shank3B*^{-/-} (Peça y col., 2011).

En la prueba de interacción social los ratones *Dyrk1a*^{+/-} muestran un déficit muy significativo en la interacción social recíproca (número y duración de los contactos olfativos; Fig. 36A). Déficit semejantes en interacción recíproca se han observado también en los modelos de *Cntap2*^{-/-} (Peñagarikano y col., 2011) y *Shank3B*^{-/-} (Peça y col., 2011).

Las crías de ratón cuando se separan de su madre emiten vocalizaciones ultrasónicas. Estas vocalizaciones inducidas representan una conducta de comunicación vocal madre-hijo que parece ser relevante en el TEA (Crawley, 2007; Silverman y col., 2010) y se han visto alteradas en el ratón *Cntap2*^{-/-} (Peñagarikano y col., 2011) y otros modelos de TEA. Estudios recientes no publicados realizados en el laboratorio del Dr. José J. Lucas

(Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid) han mostrado que los ratones postnatales *Dyrk1a*^{+/-} emiten menos vocalizaciones cuando se les separa de sus madres que los ratones *Dyrk1a*^{+/+}. Además, las vocalizaciones de los animales mutantes son significativamente más cortas que la de los controles. Este resultado junto con los resultados obtenidos en las pruebas conductuales realizadas en este trabajo muestran que los ratones *Dyrk1a* haploinsuficientes presentan conductas que son características en el TEA.

Los ratones *Dyrk1a* haploinsuficientes presentan microcefalia, retraso en el desarrollo (Fotaki y col., 2002) y alteraciones motoras y cognitivas (Arqué y col., 2008; Fotaki y col., 2004). Como hemos comentado, estos ratones presentan actividad epiléptica y características conductuales característica del TEA. Por tanto, el ratón *Dyrk1a*^{+/-} es una fenocopia de los pacientes con DI causada por mutaciones en heterocigosis en el gen *DYRK1A* (van Bon y col., 2015a) y un buen modelo para estudiar los mecanismos patogénicos en estos pacientes y, eventualmente, ensayar estrategias terapéuticas para tratar los síntomas clínicos. Por último, mencionar que los resultados obtenidos en este estudio están de acuerdo con la hipótesis inicialmente formulada por Rubenstein (2010) donde propone que el desequilibrio en la excitación/inhibición de los circuitos corticales está en la base del TEA y de la DI asociada a distintos síndromes.

CONCLUSIONES

Las conclusiones del trabajo de tesis doctoral son las siguientes:

1. Cambios en la dosis de *Dyrk1a* altera el número de neuronas de la subplaca y la densidad de las fibras cortico-talámicas.
2. La triplicación del gen *Dyrk1a* es la causa del déficit de neuronas que forman la subplaca en el ratón modelo de SD Ts65Dn.
3. La neocorteza del ratón *Dyrk1a*^{+/-} es más fina y tiene más neuronas excitadoras durante el desarrollo postnatal que los ratones control. Este exceso de neuronas se mantiene hasta edades adultas.
4. Durante la sinaptogénesis, la densidad de subtipos concretos de neuronas inhibitoras corticales está alterada tanto en los ratones *Dyrk1a*^{+/-} como en los mBACTg*Dyrk1a*.
5. La neocorteza de los ratones mBACTg*Dyrk1a* adultos tienen un déficit de neuronas excitadoras y un número de neuronas inhibitoras semejante a la de los ratones controles.
6. Los ratones *Dyrk1a*^{+/-} adultos presentan un ligero exceso de interneuronas en la neocorteza que se restringe a las capas profundas y, alteraciones en el número y la distribución de las subtipos de interneuronas PV+, SST+, CR+, NPY+ y VIP+ en las áreas CA1, CA3 y GD del hipocampo.
7. Los ratones *Dyrk1a*^{+/-} adultos presentan un incremento de la densidad de sinapsis excitadoras en las capas IV y VI de la neocorteza.
8. Los ratones *Dyrk1a*^{+/-} muestran un incremento en el número de neuronas c-Fos+ en la región CA3 del hipocampo en condiciones basales.
9. Los ratones *Dyrk1a*^{+/-} adultos muestran alteraciones en el comportamiento social y un incremento de estereotipias que son indicativas de una conducta autista.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrahams, B.S., Geschwind, D.H., 2008. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nature reviews. Genetics* 9, 341-355.
- Adayev, T., Chen-Hwang, M.C., Murakami, N., Wang, R., Hwang, Y.W., 2006. MNB/DYRK1A phosphorylation regulates the interactions of synaptojanin 1 with endocytic accessory proteins. *Biochemical and biophysical research communications* 351, 1060-1065.
- Ahn, K.J., Jeong, H.K., Choi, H.S., Ryoo, S.R., Kim, Y.J., Goo, J.S., Choi, S.Y., Han, J.S., Ha, I., Song, W.J., 2006. DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiology of disease* 22, 463-472.
- Akeson, E.C., Lambert, J.P., Narayanswami, S., Gardiner, K., Bechtel, L.J., Davisson, M.T., 2001. Ts65Dn - localization of the translocation breakpoint and trisomic gene content in a mouse model for Down syndrome. *Cytogenetics and cell genetics* 93, 270-276.
- Aldridge, K., Reeves, R.H., Olson, L.E., Richtsmeier, J.T., 2007. Differential effects of trisomy on brain shape and volume in related aneuploid mouse models. *American journal of medical genetics. Part A* 143A, 1060-1070.
- Altafaj, X., Dierssen, M., Baamonde, C., Marti, E., Visa, J., Guimera, J., Oset, M., Gonzalez, J.R., Florez, J., Fillat, C., Estivill, X., 2001. Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Human molecular genetics* 10, 1915-1923.
- Álvarez, M., Altafaj, X., Aranda, S., de la Luna, S., 2007. DYRK1A autophosphorylation on serine residue 520 modulates its kinase activity via 14-3-3 binding. *Mol Biol Cell* 18, 1167-1178.
- Álvarez, M., Estivill, X., de la Luna, S., 2003. DYRK1A accumulates in splicing speckles through a novel targeting signal and induces speckle disassembly. *J Cell Sci* 116, 3099-3107.
- Amaral, D.G., 1978. A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *The Journal of comparative neurology* 182, 851-914.
- Amaral, D.G., Witter, M.P., 1995. Hippocampal formation, Paxinos, G. ed, San Diego.

- Antonarakis, S.E., Lyle, R., Dermitzakis, E.T., Reymond, A., Deutsch, S., 2004. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nature reviews. Genetics* 5, 725-738.
- Aranda, S., Alvarez, M., Turro, S., Laguna, A., de la Luna, S., 2008. Sprouty2-mediated inhibition of fibroblast growth factor signaling is modulated by the protein kinase DYRK1A. *Molecular and cellular biology* 28, 5899-5911.
- Aranda, S., Laguna, A., de la Luna, S., 2011. DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J* 25, 449-462.
- Arimatsu, Y., Ishida, M., Kaneko, T., Ichinose, S., Omori, A., 2003. Organization and development of corticocortical associative neurons expressing the orphan nuclear receptor Nurr1. *The Journal of comparative neurology* 466, 180-196.
- Arlotta, P., Molyneaux, B.J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., Macklis, J.D., 2005. Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* 45, 207-221.
- Arqué, G., de Lagran, M.M., Arbones, M.L., Dierssen, M., 2009. Age-associated motor and visuo-spatial learning phenotype in Dyrk1A heterozygous mutant mice. *Neurobiology of disease* 36, 312-319.
- Arqué, G., Fotaki, V., Fernandez, D., Martinez de Lagran, M., Arbones, M.L., Dierssen, M., 2008. Impaired spatial learning strategies and novel object recognition in mice haploinsufficient for the dual specificity tyrosine-regulated kinase-1A (Dyrk1A). *PLoS one* 3, e2575.
- Atallah, B.V., Bruns, W., Carandini, M., Scanziani, M., 2012. Parvalbumin-expressing interneurons linearly transform cortical responses to visual stimuli. *Neuron* 73, 159-170.
- Avino, T.A., Hutsler, J.J., 2010. Abnormal cell patterning at the cortical gray-white matter boundary in autism spectrum disorders. *Brain research* 1360, 138-146.
- Aylward, E.H., Li, Q., Honeycutt, N.A., Warren, A.C., Pulsifer, M.B., Barta, P.E., Chan, M.D., Smith, P.D., Jerram, M., Pearlson, G.D., 1999. MRI volumes of the hippocampus and amygdala in adults with Down's syndrome with and without dementia. *Am J Psychiatry* 156, 564-568.
- Babb, T.L., Pretorius, J.K., Kupfer, W.R., Brown, W.J., 1988. Distribution of glutamate-decarboxylase-immunoreactive neurons and synapses in the rat and monkey

- hippocampus: light and electron microscopy. *The Journal of comparative neurology* 278, 121-138.
- Bailey, A., Luthert, P., Dean, A., Harding, B., Janota, I., Montgomery, M., Rutter, M., Lantos, P., 1998. A clinicopathological study of autism. *Brain : a journal of neurology* 121 (Pt 5), 889-905.
- Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M., Cohen, P., 2003. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *The Biochemical journal* 371, 199-204.
- Barallobre, M.J., Perier, C., Bove, J., Laguna, A., Delabar, J.M., Vila, M., Arbones, M.L., 2014. DYRK1A promotes dopaminergic neuron survival in the developing brain and in a mouse model of Parkinson's disease. *Cell Death Dis* 5, e1289.
- Bartolini, G., Ciceri, G., Marin, O., 2013. Integration of GABAergic interneurons into cortical cell assemblies: lessons from embryos and adults. *Neuron* 79, 849-864.
- Baxter, L.L., Moran, T.H., Richtsmeier, J.T., Troncoso, J., Reeves, R.H., 2000. Discovery and genetic localization of Down syndrome cerebellar phenotypes using the Ts65Dn mouse. *Human molecular genetics* 9, 195-202.
- Bayer, S.A., 1980. Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *The Journal of comparative neurology* 190, 87-114.
- Becker, L.E., Armstrong, D.L., Chan, F., 1986. Dendritic atrophy in children with Down's syndrome. *Ann Neurol* 20, 520-526.
- Becker, W., Joost, H.G., 1999. Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 62, 1-17.
- Becker, W., Sippl, W., 2011. Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A. *FEBS J* 278, 246-256.
- Becker, W., Weber, Y., Wetzel, K., Eirnbter, K., Tejedor, F.J., Joost, H.G., 1998. Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 273, 25893-25902.
- Belichenko, N.P., Belichenko, P.V., Kleschevnikov, A.M., Salehi, A., Reeves, R.H., Mobley, W.C., 2009a. The "Down syndrome critical region" is sufficient in the mouse model to

- confer behavioral, neurophysiological, and synaptic phenotypes characteristic of Down syndrome. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 5938-5948.
- Belichenko, P.V., Kleschevnikov, A.M., Becker, A., Wagner, G.E., Lysenko, L.V., Yu, Y.E., Mobley, W.C., 2015. Down Syndrome Cognitive Phenotypes Modeled in Mice Trisomic for All HSA 21 Homologues. *PloS one* 10, e0134861.
- Belichenko, P.V., Kleschevnikov, A.M., Masliah, E., Wu, C., Takimoto-Kimura, R., Salehi, A., Mobley, W.C., 2009b. Excitatory-inhibitory relationship in the fascia dentata in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *The Journal of comparative neurology* 512, 453-466.
- Belichenko, P.V., Masliah, E., Kleschevnikov, A.M., Villar, A.J., Epstein, C.J., Salehi, A., Mobley, W.C., 2004. Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of Down Syndrome. *The Journal of comparative neurology* 480, 281-298.
- Benavides-Piccione, R., Dierssen, M., Ballesteros-Yanez, I., Martinez de Lagran, M., Arbones, M.L., Fotaki, V., DeFelipe, J., Elston, G.N., 2005. Alterations in the phenotype of neocortical pyramidal cells in the Dyrk1A^{+/-} mouse. *Neurobiology of disease* 20, 115-122.
- Berger, T.K., Perin, R., Silberberg, G., Markram, H., 2009. Frequency-dependent disynaptic inhibition in the pyramidal network: a ubiquitous pathway in the developing rat neocortex. *J Physiol* 587, 5411-5425.
- Blaschke, A.J., Staley, K., Chun, J., 1996. Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development* 122, 1165-1174.
- Bolivar, V.J., Walters, S.R., Phoenix, J.L., 2007. Assessing autism-like behavior in mice: variations in social interactions among inbred strains. *Behavioural brain research* 176, 21-26.
- Bozzi, Y., Casarosa, S., Caleo, M., 2012. Epilepsy as a neurodevelopmental disorder. *Front Psychiatry* 3, 19.
- Brakeman, P.R., Lanahan, A.A., O'Brien, R., Roche, K., Barnes, C.A., Huganir, R.L., Worley, P.F., 1997. Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386, 284-288.

- Bronicki, L.M., Redin, C., Drunat, S., Piton, A., Lyons, M., Passemard, S., Baumann, C., Faivre, L., Thevenon, J., Riviere, J.B., Isidor, B., Gan, G., Francannet, C., Willems, M., Gunel, M., Jones, J.R., Gleeson, J.G., Mandel, J.L., Stevenson, R.E., Friez, M.J., Aylsworth, A.S., 2015. Ten new cases further delineate the syndromic intellectual disability phenotype caused by mutations in DYRK1A. *European journal of human genetics* : EJHG.
- Brooks-Kayal, A., 2010. Epilepsy and autism spectrum disorders: are there common developmental mechanisms? *Brain & development* 32, 731-738.
- Cai, L., Hayes, N.L., Takahashi, T., Caviness, V.S., Jr., Nowakowski, R.S., 2002. Size distribution of retrovirally marked lineages matches prediction from population measurements of cell cycle behavior. *J Neurosci Res* 69, 731-744.
- Caubet, J.F., 1989. c-fos proto-oncogene expression in the nervous system during mouse development. *Molecular and cellular biology* 9, 2269-2272.
- Chabert, C., Jamon, M., Cherfouh, A., Duquenne, V., Smith, D.J., Rubin, E., Roubertoux, P.L., 2004. Functional analysis of genes implicated in Down syndrome: 1. Cognitive abilities in mice transpolygenic for Down Syndrome Chromosomal Region-1 (DCR-1). *Behav Genet* 34, 559-569.
- Chakrabarti, L., Best, T.K., Cramer, N.P., Carney, R.S., Isaac, J.T., Galdzicki, Z., Haydar, T.F., 2010. Olig1 and Olig2 triplication causes developmental brain defects in Down syndrome. *Nature neuroscience* 13, 927-934.
- Chakrabarti, L., Galdzicki, Z., Haydar, T.F., 2007. Defects in embryonic neurogenesis and initial synapse formation in the forebrain of the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 11483-11495.
- Chang, B., Hawes, N.L., Hurd, R.E., Davisson, M.T., Nusinowitz, S., Heckenlively, J.R., 2002. Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res* 42, 517-525.
- Chapman, R.S., Hesketh, L.J., 2000. Behavioral phenotype of individuals with Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 6, 84-95.
- Chen, J.Y., Lin, J.R., Tsai, F.C., Meyer, T., 2013. Dosage of Dyrk1a shifts cells within a p21-cyclin D1 signaling map to control the decision to enter the cell cycle. *Molecular cell* 52, 87-100.

- Chen, Y., Magnani, D., Theil, T., Pratt, T., Price, D.J., 2012. Evidence that descending cortical axons are essential for thalamocortical axons to cross the pallial-subpallial boundary in the embryonic forebrain. *PLoS one* 7, e33105.
- Chen-Hwang, M.C., Chen, H.R., Elzinga, M., Hwang, Y.W., 2002. Dynamin is a minibrain kinase/dual specificity Yak1-related kinase 1A substrate. *The Journal of biological chemistry* 277, 17597-17604.
- Cheng, A., Haydar, T.F., Yarowsky, P.J., Krueger, B.K., 2004. Concurrent generation of subplate and cortical plate neurons in developing trisomy 16 mouse cortex. *Developmental neuroscience* 26, 255-265.
- Chettouh, Z., Croquette, M.F., Delobel, B., Gilgenkrants, S., Leonard, C., Maunoury, C., Prieur, M., Rethore, M.O., Sinet, P.M., Chery, M., et al., 1995. Molecular mapping of 21 features associated with partial monosomy 21: involvement of the APP-SOD1 region. *American journal of human genetics* 57, 62-71.
- Choong, X.Y., Tosh, J.L., Pulford, L.J., Fisher, E.M., 2015. Dissecting Alzheimer disease in Down syndrome using mouse models. *Frontiers in behavioral neuroscience* 9, 268.
- Chung, W., Park, S., Hong, J., Park, S., Lee, S., Heo, J., Kim, D., Ko, Y., 2015. Sevoflurane exposure during the neonatal period induces long-term memory impairment but not autism-like behaviors. *Paediatric anaesthesia* 25, 1033-1045.
- Clark, S., Schwalbe, J., Stasko, M.R., Yarowsky, P.J., Costa, A.C., 2006. Fluoxetine rescues deficient neurogenesis in hippocampus of the Ts65Dn mouse model for Down syndrome. *Exp Neurol* 200, 256-261.
- Costa, A.C., Walsh, K., Davisson, M.T., 1999. Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome. *Physiol Behav* 68, 211-220.
- Courcet, J.B., Faivre, L., Malzac, P., Masurel-Paulet, A., Lopez, E., Callier, P., Lambert, L., Lemesle, M., Thevenon, J., Gigot, N., Duplomb, L., Ragon, C., Marle, N., Mosca-Boidron, A.L., Huet, F., Philippe, C., Moncla, A., Thauvin-Robinet, C., 2012. The DYRK1A gene is a cause of syndromic intellectual disability with severe microcephaly and epilepsy. *Journal of medical genetics* 49, 731-736.
- Cramer, N.P., Xu, X., T, F.H., Galdzicki, Z., 2015. Altered intrinsic and network properties of neocortical neurons in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Physiological reports* 3.

- Crawley, J.N., 2007. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain pathology* 17, 448-459.
- da Costa Martins, P.A., Salic, K., Gladka, M.M., Armand, A.S., Leptidis, S., el Azzouzi, H., Hansen, A., Coenen-de Roo, C.J., Bierhuizen, M.F., van der Nagel, R., van Kuik, J., de Weger, R., de Bruin, A., Condorelli, G., Arbones, M.L., Eschenhagen, T., De Windt, L.J., 2010. MicroRNA-199b targets the nuclear kinase Dyrk1a in an auto-amplification loop promoting calcineurin/NFAT signalling. *Nat Cell Biol* 12, 1220-1227.
- Davisson, M.T., Schmidt, C., Akeson, E.C., 1990. Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 360, 263-280.
- Davisson, M.T., Schmidt, C., Reeves, R.H., Irving, N.G., Akeson, E.C., Harris, B.S., Bronson, R.T., 1993. Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 384, 117-133.
- De Boer, S.F., Koolhaas, J.M., 2003. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *European journal of pharmacology* 463, 145-161.
- DeFelipe, J., Lopez-Cruz, P.L., Benavides-Piccione, R., Bielza, C., Larranaga, P., Anderson, S., Burkhalter, A., Cauli, B., Fairen, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fitzpatrick, D., Freund, T.F., Gonzalez-Burgos, G., Hestrin, S., Hill, S., Hof, P.R., Huang, J., Jones, E.G., Kawaguchi, Y., Kisvarday, Z., Kubota, Y., Lewis, D.A., Marin, O., Markram, H., McBain, C.J., Meyer, H.S., Monyer, H., Nelson, S.B., Rockland, K., Rossier, J., Rubenstein, J.L., Rudy, B., Scanziani, M., Shepherd, G.M., Sherwood, C.C., Staiger, J.F., Tamas, G., Thomson, A., Wang, Y., Yuste, R., Ascoli, G.A., 2013. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nature reviews. Neuroscience* 14, 202-216.
- Dehay, C., Kennedy, H., 2007. Cell-cycle control and cortical development. *Nature reviews. Neuroscience* 8, 438-450.
- Delabar, J.M., Theophile, D., Rahmani, Z., Chettouh, Z., Blouin, J.L., Prieur, M., Noel, B., Sinet, P.M., 1993. Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *European journal of human genetics : EJHG* 1, 114-124.
- Di Vona, C., Bezdán, D., Islam, A.B., Salichs, E., Lopez-Bigas, N., Ossowski, S., de la Luna, S., 2015. Chromatin-wide profiling of DYRK1A reveals a role as a gene-specific RNA polymerase II CTD kinase. *Molecular cell* 57, 506-520.

- Dierssen, M., Benavides-Piccione, R., Martinez-Cue, C., Estivill, X., Florez, J., Elston, G.N., DeFelipe, J., 2003. Alterations of neocortical pyramidal cell phenotype in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: effects of environmental enrichment. *Cerebral cortex* 13, 758-764.
- Duchon, A., Herault, Y., 2016. DYRK1A, a Dosage-Sensitive Gene Involved in Neurodevelopmental Disorders, Is a Target for Drug Development in Down Syndrome. *Frontiers in behavioral neuroscience* 10, 104.
- Epstein, C.J., 2002. 2001 William Allan Award Address. From Down syndrome to the "human" in "human genetics". *American journal of human genetics* 70, 300-313.
- Ferencz, C., Neill, C.A., Boughman, J.A., Rubin, J.D., Brenner, J.I., Perry, L.W., 1989. Congenital cardiovascular malformations associated with chromosome abnormalities: an epidemiologic study. *J Pediatr* 114, 79-86.
- Fernández, F., Morishita, W., Zuniga, E., Nguyen, J., Blank, M., Malenka, R.C., Garner, C.C., 2007. Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome. *Nature neuroscience* 10, 411-413.
- Fernández-Martinez, J., Vela, E.M., Tora-Ponsioen, M., Ocana, O.H., Nieto, M.A., Galceran, J., 2009. Attenuation of Notch signalling by the Down-syndrome-associated kinase DYRK1A. *J Cell Sci* 122, 1574-1583.
- Ferrer, I., Soriano, E., del Rio, J.A., Alcantara, S., Auladell, C., 1992. Cell death and removal in the cerebral cortex during development. *Prog Neurobiol* 39, 1-43.
- Ferron, S.R., Pozo, N., Laguna, A., Aranda, S., Porlan, E., Moreno, M., Fillat, C., de la Luna, S., Sanchez, P., Arbones, M.L., Farinas, I., 2010. Regulated segregation of kinase Dyrk1A during asymmetric neural stem cell division is critical for EGFR-mediated biased signaling. *Cell Stem Cell* 7, 367-379.
- Fotaki, V., Dierssen, M., Alcantara, S., Martinez, S., Marti, E., Casas, C., Visa, J., Soriano, E., Estivill, X., Arbones, M.L., 2002. Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Molecular and cellular biology* 22, 6636-6647.
- Fotaki, V., Martinez De Lagran, M., Estivill, X., Arbones, M., Dierssen, M., 2004. Haploinsufficiency of Dyrk1A in mice leads to specific alterations in the development and regulation of motor activity. *Behav Neurosci* 118, 815-821.

- Franco, S.J., Muller, U., 2013. Shaping our minds: stem and progenitor cell diversity in the mammalian neocortex. *Neuron* 77, 19-34.
- Freund, T.F., Buzsáki, G., 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347-470.
- Frostad, W.A., Cleall, J.F., Melosky, L.C., 1971. Craniofacial complex in the trisomy 21 syndrome (Down's syndrome). *Archives of oral biology* 16, 707-722.
- Fujita, H., Torii, C., Kosaki, R., Yamaguchi, S., Kudoh, J., Hayashi, K., Takahashi, T., Kosaki, K., 2010. Microdeletion of the Down syndrome critical region at 21q22. *American journal of medical genetics. Part A* 152A, 950-953.
- Fushiki, S., Schachner, M., 1986. Immunocytochemical localization of cell adhesion molecules L1 and N-CAM and the shared carbohydrate epitope L2 during development of the mouse neocortex. *Brain research* 389, 153-167.
- Galante, M., Jani, H., Vanes, L., Daniel, H., Fisher, E.M., Tybulewicz, V.L., Bliss, T.V., Morice, E., 2009. Impairments in motor coordination without major changes in cerebellar plasticity in the Tc1 mouse model of Down syndrome. *Human molecular genetics* 18, 1449-1463.
- García-Cerro, S., Martínez, P., Vidal, V., Corrales, A., Florez, J., Vidal, R., Rueda, N., Arbones, M.L., Martínez-Cue, C., 2014. Overexpression of Dyrk1A is implicated in several cognitive, electrophysiological and neuromorphological alterations found in a mouse model of Down syndrome. *PloS one* 9, e106572.
- Garel, S., Lopez-Bendito, G., 2014. Inputs from the thalamocortical system on axon pathfinding mechanisms. *Current opinion in neurobiology* 27, 143-150.
- Gatto, C.L., Broadie, K., 2010. Genetic controls balancing excitatory and inhibitory synaptogenesis in neurodevelopmental disorder models. *Frontiers in synaptic neuroscience* 2, 4.
- Gearhart, J.D., Singer, H.S., Moran, T.H., Tiemeyer, M., Oster-Granite, M.L., Coyle, J.T., 1986. Mouse chimeras composed of trisomy 16 and normal (2N) cells: preliminary studies. *Brain Res Bull* 16, 815-824.
- Gelman, D.M., Marin, O., 2010. Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 31, 2136-2141.

- Gentet, L.J., Kremer, Y., Taniguchi, H., Huang, Z.J., Staiger, J.F., Petersen, C.C., 2012. Unique functional properties of somatostatin-expressing GABAergic neurons in mouse barrel cortex. *Nature neuroscience* 15, 607-612.
- Göckler, N., Jofre, G., Papadopoulos, C., Soppa, U., Tejedor, F.J., Becker, W., 2009. Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS J* 276, 6324-6337.
- Golden, J.A., Hyman, B.T., 1994. Development of the superior temporal neocortex is anomalous in trisomy 21. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 53, 513-520.
- Gonchar, Y., Wang, Q., Burkhalter, A., 2008. Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. *Frontiers in neuroanatomy* 1, 3.
- Grau, C., Arato, K., Fernandez-Fernandez, J.M., Valderrama, A., Sindreu, C., Fillat, C., Ferrer, I., de la Luna, S., Altafaj, X., 2014. DYRK1A-mediated phosphorylation of GluN2A at Ser(1048) regulates the surface expression and channel activity of GluN1/GluN2A receptors. *Frontiers in cellular neuroscience* 8, 331.
- Greig, L.C., Woodworth, M.B., Galazo, M.J., Padmanabhan, H., Macklis, J.D., 2013. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nature reviews. Neuroscience* 14, 755-769.
- Gropp, A., Kolbus, U., Giers, D., 1975. Systematic approach to the study of trisomy in the mouse. II. *Cytogenetics and cell genetics* 14, 42-62.
- Guedj, F., Pereira, P.L., Najas, S., Barallobre, M.J., Chabert, C., Souchet, B., Sebrie, C., Verney, C., Herault, Y., Arbones, M., Delabar, J.M., 2012. DYRK1A: a master regulatory protein controlling brain growth. *Neurobiology of disease* 46, 190-203.
- Guedj, F., Sebrie, C., Rivals, I., Ledru, A., Paly, E., Bizot, J.C., Smith, D., Rubin, E., Gillet, B., Arbones, M., Delabar, J.M., 2009. Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by overexpression of DYRK1A. *PLoS one* 4, e4606.
- Guihard-Costa, A.M., Khung, S., Delbecq, K., Menez, F., Delezoide, A.L., 2006. Biometry of face and brain in fetuses with trisomy 21. *Pediatr Res* 59, 33-38.
- Guimerá, J., Casas, C., Pucharcos, C., Solans, A., Domenech, A., Planas, A.M., Ashley, J., Lovett, M., Estivill, X., Pritchard, M.A., 1996. A human homologue of *Drosophila*

- minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Human molecular genetics* 5, 1305-1310.
- Hall, B., 1965. Delayed ontogenesis in human trisomy syndromes. *Hereditas* 52, 334-344.
- Hämmerle, B., Carnicero, A., Elizalde, C., Ceron, J., Martinez, S., Tejedor, F.J., 2003. Expression patterns and subcellular localization of the Down syndrome candidate protein MNB/DYRK1A suggest a role in late neuronal differentiation. *Eur J Neurosci* 17, 2277-2286.
- Hämmerle, B., Elizalde, C., Tejedor, F.J., 2008. The spatio-temporal and subcellular expression of the candidate Down syndrome gene Mnb/Dyrk1A in the developing mouse brain suggests distinct sequential roles in neuronal development. *Eur J Neurosci* 27, 1061-1074.
- Hämmerle, B., Vera-Samper, E., Speicher, S., Arencibia, R., Martinez, S., Tejedor, F.J., 2002. Mnb/Dyrk1A is transiently expressed and asymmetrically segregated in neural progenitor cells at the transition to neurogenic divisions. *Dev Biol* 246, 259-273.
- Hassold, T., Hunt, P., 2001. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature reviews. Genetics* 2, 280-291.
- Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T.D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H.S., Toyoda, A., Ishii, K., Totoki, Y., Choi, D.K., Groner, Y., Soeda, E., Ohki, M., Takagi, T., Sakaki, Y., Taudien, S., Blechschmidt, K., Polley, A., Menzel, U., Delabar, J., Kumpf, K., Lehmann, R., Patterson, D., Reichwald, K., Rump, A., Schillhabel, M., Schudy, A., Zimmermann, W., Rosenthal, A., Kudoh, J., Schibuya, K., Kawasaki, K., Asakawa, S., Shintani, A., Sasaki, T., Nagamine, K., Mitsuyama, S., Antonarakis, S.E., Minoshima, S., Shimizu, N., Nordsiek, G., Hornischer, K., Brant, P., Scharfe, M., Schon, O., Desario, A., Reichelt, J., Kauer, G., Blocker, H., Ramser, J., Beck, A., Klages, S., Hennig, S., Riesselmann, L., Dagand, E., Haaf, T., Wehrmeyer, S., Borzym, K., Gardiner, K., Nizetic, D., Francis, F., Lehrach, H., Reinhardt, R., Yaspo, M.L., Chromosome, m., sequencing, c., 2000. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 405, 311-319.
- Haydar, T.F., Blue, M.E., Molliver, M.E., Krueger, B.K., Yarowsky, P.J., 1996. Consequences of trisomy 16 for mouse brain development: corticogenesis in a model of Down syndrome. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 6175-6182.

- Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Flavell, R.A., Rakic, P., 1999. The role of cell death in regulating the size and shape of the mammalian forebrain. *Cerebral cortex* 9, 621-626.
- Haydar, T.F., Reeves, R.H., 2012. Trisomy 21 and early brain development. *Trends in neurosciences* 35, 81-91.
- Hevner, R.F., Shi, L., Justice, N., Hsueh, Y., Sheng, M., Smiga, S., Bulfone, A., Goffinet, A.M., Campagnoni, A.T., Rubenstein, J.L., 2001. Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* 29, 353-366.
- Himpel, S., Tegge, W., Frank, R., Leder, S., Joost, H.G., Becker, W., 2000. Specificity determinants of substrate recognition by the protein kinase DYRK1A. *The Journal of biological chemistry* 275, 2431-2438.
- Hoerder-Suabedissen, A., Molnar, Z., 2013. Molecular diversity of early-born subplate neurons. *Cerebral cortex* 23, 1473-1483.
- Hoerder-Suabedissen, A., Molnar, Z., 2015. Development, evolution and pathology of neocortical subplate neurons. *Nature reviews. Neuroscience* 16, 133-146.
- Hoerder-Suabedissen, A., Oeschger, F.M., Krishnan, M.L., Belgard, T.G., Wang, W.Z., Lee, S., Webber, C., Petretto, E., Edwards, A.D., Molnar, Z., 2013. Expression profiling of mouse subplate reveals a dynamic gene network and disease association with autism and schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 3555-3560.
- Holtzman, D.M., Santucci, D., Kilbridge, J., Chua-Couzens, J., Fontana, D.J., Daniels, S.E., Johnson, R.M., Chen, K., Sun, Y., Carlson, E., Alleva, E., Epstein, C.J., Mobley, W.C., 1996. Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13333-13338.
- Huang, T.N., Hsueh, Y.P., 2015. Brain-specific transcriptional regulator T-brain-1 controls brain wiring and neuronal activity in autism spectrum disorders. *Frontiers in neuroscience* 9, 406.
- Huang, Y., Chen-Hwang, M.C., Dolios, G., Murakami, N., Padovan, J.C., Wang, R., Hwang, Y.W., 2004. Mnb/Dyrk1A phosphorylation regulates the interaction of dynamin 1 with SH3 domain-containing proteins. *Biochemistry* 43, 10173-10185.

- Hutsler, J.J., Love, T., Zhang, H., 2007. Histological and magnetic resonance imaging assessment of cortical layering and thickness in autism spectrum disorders. *Biological psychiatry* 61, 449-457.
- Iglesias, A., Anyane-Yeboa, K., Wynn, J., Wilson, A., Truitt Cho, M., Guzman, E., Sisson, R., Egan, C., Chung, W.K., 2014. The usefulness of whole-exome sequencing in routine clinical practice. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 16, 922-931.
- Insausti, A.M., Megias, M., Crespo, D., Cruz-Orive, L.M., Dierssen, M., Vallina, I.F., Insausti, R., Florez, J., 1998. Hippocampal volume and neuronal number in Ts65Dn mice: a murine model of Down syndrome. *Neuroscience letters* 253, 175-178.
- Insausti, R., Tunon, T., Sobreviela, T., Insausti, A.M., Gonzalo, L.M., 1995. The human entorhinal cortex: a cytoarchitectonic analysis. *The Journal of comparative neurology* 355, 171-198.
- Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., Rosenbaum, J., Yamrom, B., Lee, Y.H., Narzisi, G., Leotta, A., Kendall, J., Grabowska, E., Ma, B., Marks, S., Rodgers, L., Stepansky, A., Troge, J., Andrews, P., Bekritsky, M., Pradhan, K., Ghiban, E., Kramer, M., Parla, J., Demeter, R., Fulton, L.L., Fulton, R.S., Magrini, V.J., Ye, K., Darnell, J.C., Darnell, R.B., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Schatz, M.C., McCombie, W.R., Wigler, M., 2012. De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* 74, 285-299.
- Isaacson, J.S., Scanziani, M., 2011. How inhibition shapes cortical activity. *Neuron* 72, 231-243.
- Ji, J., Lee, H., Argiropoulos, B., Dorrani, N., Mann, J., Martinez-Agosto, J.A., Gomez-Ospina, N., Gallant, N., Bernstein, J.A., Hudgins, L., Slattery, L., Isidor, B., Le Caignec, C., David, A., Oberszty, E., Wisniewiecka-Kowalnik, B., Fox, M., Deignan, J.L., Vilain, E., Hendricks, E., Horton Harr, M., Noon, S.E., Jackson, J.R., Wilkens, A., Mirzaa, G., Salamon, N., Abramson, J., Zackai, E.H., Krantz, I., Innes, A.M., Nelson, S.F., Grody, W.W., Quintero-Rivera, F., 2015. DYRK1A haploinsufficiency causes a new recognizable syndrome with microcephaly, intellectual disability, speech impairment, and distinct facies. *European journal of human genetics : EJHG*.
- Jiang, M., Swann, J.W., 1997. Expression of calretinin in diverse neuronal populations during development of rat hippocampus. *Neuroscience* 81, 1137-1154.
- Jones, P., 1984. *Classification of cortical neurons*. Plenum Press, New York.

- Karmiloff-Smith, A., Al-Janabi, T., D'Souza, H., Groet, J., Massand, E., Mok, K., Startin, C., Fisher, E., Hardy, J., Nizetic, D., Tybulewicz, V., Strydom, A., 2016. The importance of understanding individual differences in Down syndrome. *F1000Research* 5.
- Kentrup, H., Becker, W., Heukelbach, J., Wilmes, A., Schurmann, A., Huppertz, C., Kainulainen, H., Joost, H.G., 1996. Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *The Journal of biological chemistry* 271, 3488-3495.
- Kim, M.Y., Jeong, B.C., Lee, J.H., Kee, H.J., Kook, H., Kim, N.S., Kim, Y.H., Kim, J.K., Ahn, K.Y., Kim, K.K., 2006. A repressor complex, AP4 transcription factor and geminin, negatively regulates expression of target genes in nonneuronal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 13074-13079.
- Kirsammer, G., Jilani, S., Liu, H., Davis, E., Gurbuxani, S., Le Beau, M.M., Crispino, J.D., 2008. Highly penetrant myeloproliferative disease in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Blood* 111, 767-775.
- Kleschevnikov, A.M., Belichenko, P.V., Villar, A.J., Epstein, C.J., Malenka, R.C., Mobley, W.C., 2004. Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 8153-8160.
- Korbel, J.O., Tirosh-Wagner, T., Urban, A.E., Chen, X.N., Kasowski, M., Dai, L., Grubert, F., Erdman, C., Gao, M.C., Lange, K., Sobel, E.M., Barlow, G.M., Aylsworth, A.S., Carpenter, N.J., Clark, R.D., Cohen, M.Y., Doran, E., Falik-Zaccai, T., Lewin, S.O., Lott, I.T., McGillivray, B.C., Moeschler, J.B., Pettenati, M.J., Puschel, S.M., Rao, K.W., Shaffer, L.G., Shohat, M., Van Riper, A.J., Warburton, D., Weissman, S., Gerstein, M.B., Snyder, M., Korenberg, J.R., 2009. The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 12031-12036.
- Korenberg, J.R., Chen, X.N., Schipper, R., Sun, Z., Gonsky, R., Gerwehr, S., Carpenter, N., Daumer, C., Dignan, P., Distech, C., et al., 1994. Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 4997-5001.
- Kriegstein, A., Alvarez-Buylla, A., 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32, 149-184.

- Kuhn, D.E., Nuovo, G.J., Martin, M.M., Malana, G.E., Pleister, A.P., Jiang, J., Schmittgen, T.D., Terry, A.V., Jr., Gardiner, K., Head, E., Feldman, D.S., Elton, T.S., 2008. Human chromosome 21-derived miRNAs are overexpressed in down syndrome brains and hearts. *Biochemical and biophysical research communications* 370, 473-477.
- Kurt, M.A., Davies, D.C., Kidd, M., Dierssen, M., Florez, J., 2000. Synaptic deficit in the temporal cortex of partial trisomy 16 (Ts65Dn) mice. *Brain research* 858, 191-197.
- Lacey-Casem, M.L., Oster-Granite, M.L., 1994. The neuropathology of the trisomy 16 mouse. *Critical reviews in neurobiology* 8, 293-322.
- Laguna, A., 2008. Study of DYRK1A Kinase in Central Nervous System Development: Implication in Mouse Retina Development. Universitat Pompeu Fabra.
- Laguna, A., Aranda, S., Barallobre, M.J., Barhoum, R., Fernandez, E., Fotaki, V., Delabar, J.M., de la Luna, S., de la Villa, P., Arbones, M.L., 2008. The protein kinase DYRK1A regulates caspase-9-mediated apoptosis during retina development. *Developmental cell* 15, 841-853.
- Laguna, A., Barallobre, M.J., Marchena, M.A., Mateus, C., Ramirez, E., Martinez-Cue, C., Delabar, J.M., Castelo-Branco, M., de la Villa, P., Arbones, M.L., 2013. Triplication of DYRK1A causes retinal structural and functional alterations in Down syndrome. *Human molecular genetics* 22, 2775-2784.
- Larsen, K.B., Laursen, H., Graem, N., Samuelsen, G.B., Bogdanovic, N., Pakkenberg, B., 2008. Reduced cell number in the neocortical part of the human fetal brain in Down syndrome. *Ann Anat* 190, 421-427.
- Latash, M.L., Corcos, D.M., 1991. Kinematic and electromyographic characteristics of single-joint movements of individuals with Down syndrome. *American journal of mental retardation* : AJMR 96, 189-201.
- Leifer, D., Krainc, D., Yu, Y.T., McDermott, J., Breitbart, R.E., Heng, J., Neve, R.L., Kosofsky, B., Nadal-Ginard, B., Lipton, S.A., 1993. MEF2C, a MADS/MEF2-family transcription factor expressed in a laminar distribution in cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 1546-1550.
- Lepagnol-Bestel, A.M., Zvara, A., Maussion, G., Quignon, F., Ngimbous, B., Ramoz, N., Imbeaud, S., Loe-Mie, Y., Benihoud, K., Agier, N., Salin, P.A., Cardona, A., Khung-Savatovsky, S., Kallunki, P., Delabar, J.M., Puskas, L.G., Delacroix, H., Aggerbeck, L., Delezoide, A.L., Delattre, O., Gorwood, P., Moalic, J.M., Simonneau, M., 2009.

- DYRK1A interacts with the REST/NRSF-SWI/SNF chromatin remodelling complex to deregulate gene clusters involved in the neuronal phenotypic traits of Down syndrome. *Human molecular genetics* 18, 1405-1414.
- Letourneau, A., Santoni, F.A., Bonilla, X., Sailani, M.R., Gonzalez, D., Kind, J., Chevalier, C., Thurman, R., Sandstrom, R.S., Hibaoui, Y., Garieri, M., Popadin, K., Falconnet, E., Gagnebin, M., Gehrig, C., Vannier, A., Guipponi, M., Farinelli, L., Robyr, D., Migliavacca, E., Borel, C., Deutsch, S., Feki, A., Stamatoyannopoulos, J.A., Herault, Y., van Steensel, B., Guigo, R., Antonarakis, S.E., 2014. Domains of genome-wide gene expression dysregulation in Down's syndrome. *Nature* 508, 345-350.
- Levy, J., 1991. The gastrointestinal tract in Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 373, 245-256.
- Li, D., Jackson, R.A., Yusoff, P., Guy, G.R., 2010. Direct association of Sprouty-related protein with an EVH1 domain (SPRED) 1 or SPRED2 with DYRK1A modifies substrate/kinase interactions. *The Journal of biological chemistry* 285, 35374-35385.
- Li, Z., Yu, T., Morishima, M., Pao, A., LaDuca, J., Conroy, J., Nowak, N., Matsui, S., Shiraishi, I., Yu, Y.E., 2007. Duplication of the entire 22.9 Mb human chromosome 21 syntenic region on mouse chromosome 16 causes cardiovascular and gastrointestinal abnormalities. *Human molecular genetics* 16, 1359-1366.
- Lin, C.W., Hsueh, Y.P., 2014. Sarm1, a neuronal inflammatory regulator, controls social interaction, associative memory and cognitive flexibility in mice. *Brain, behavior, and immunity* 37, 142-151.
- Liu, D.P., Schmidt, C., Billings, T., Davisson, M.T., 2003. Quantitative PCR genotyping assay for the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *BioTechniques* 35, 1170-1174, 1176, 1178 passim.
- Liu, X., Ramirez, S., Pang, P.T., Puryear, C.B., Govindarajan, A., Deisseroth, K., Tonegawa, S., 2012. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature* 484, 381-385.
- Lochhead, P.A., Sibbet, G., Morrice, N., Cleghon, V., 2005. Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs. *Cell* 121, 925-936.
- Lodato, S., Arlotta, P., 2015. Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex. *Annual review of cell and developmental biology* 31, 699-720.

- Lodato, S., Rouaux, C., Quast, K.B., Jantrachotechatchawan, C., Studer, M., Hensch, T.K., Arlotta, P., 2011. Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron* 69, 763-779.
- Lorenzi, H.A., Reeves, R.H., 2006. Hippocampal hypocellularity in the Ts65Dn mouse originates early in development. *Brain research* 1104, 153-159.
- Lübbers, K., Wolff, J.R., Frotscher, M., 1985. Neurogenesis of GABAergic neurons in the rat dentate gyrus: a combined autoradiographic and immunocytochemical study. *Neuroscience letters* 62, 317-322.
- Luco, S.M., Pohl, D., Sell, E., Wagner, J.D., Dymont, D.A., Daoud, H., 2016. Case report of novel DYRK1A mutations in 2 individuals with syndromic intellectual disability and a review of the literature. *BMC medical genetics* 17, 15.
- Maenz, B., Hekerman, P., Vela, E.M., Galceran, J., Becker, W., 2008. Characterization of the human DYRK1A promoter and its regulation by the transcription factor E2F1. *BMC Mol Biol* 9, 30.
- Magnani, D., Hasenpusch-Theil, K., Theil, T., 2013. Gli3 controls subplate formation and growth of cortical axons. *Cerebral cortex* 23, 2542-2551.
- Mann, D.M., Yates, P.O., Marcyniuk, B., Ravindra, C.R., 1985. Pathological evidence for neurotransmitter deficits in Down's syndrome of middle age. *J Ment Defic Res* 29 (Pt 2), 125-135.
- Mao, J., Maye, P., Kogerman, P., Tejedor, F.J., Toftgard, R., Xie, W., Wu, G., Wu, D., 2002. Regulation of Gli1 transcriptional activity in the nucleus by Dyrk1. *The Journal of biological chemistry* 277, 35156-35161.
- Marín, O., 2012. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nature reviews. Neuroscience* 13, 107-120.
- Marín-Padilla, M., 1976. Pyramidal cell abnormalities in the motor cortex of a child with Down's syndrome. A Golgi study. *The Journal of comparative neurology* 167, 63-81.
- Marín-Padilla, M., 1978. Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anatomy and embryology* 152, 109-126.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., Wu, C., 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature reviews. Neuroscience* 5, 793-807.

- Marti, E., Altafaj, X., Dierssen, M., de la Luna, S., Fotaki, V., Alvarez, M., Perez-Riba, M., Ferrer, I., Estivill, X., 2003. Dyrk1A expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system. *Brain research* 964, 250-263.
- Martinez de Lagran, M., Altafaj, X., Gallego, X., Marti, E., Estivill, X., Sahun, I., Fillat, C., Dierssen, M., 2004. Motor phenotypic alterations in TgDyrk1a transgenic mice implicate DYRK1A in Down syndrome motor dysfunction. *Neurobiology of disease* 15, 132-142.
- Martínez de Lagran, M., Benavides-Piccione, R., Ballesteros-Yanez, I., Calvo, M., Morales, M., Fillat, C., Defelipe, J., Ramakers, G.J., Dierssen, M., 2012. Dyrk1A influences neuronal morphogenesis through regulation of cytoskeletal dynamics in mammalian cortical neurons. *Cerebral cortex* 22, 2867-2877.
- Matsumoto, N., Ohashi, H., Tsukahara, M., Kim, K.C., Soeda, E., Niikawa, N., 1997. Possible narrowed assignment of the loci of monosomy 21-associated microcephaly and intrauterine growth retardation to a 1.2-Mb segment at 21q22.2. *American journal of human genetics* 60, 997-999.
- McFadden, K., Minshew, N.J., 2013. Evidence for dysregulation of axonal growth and guidance in the etiology of ASD. *Frontiers in human neuroscience* 7, 671.
- Miller, M.W., 1988. Development of projection and local circuit neurons in neocortex. in *Development and maturation of cerebral cortex* Plenum Press, New York.
- Miller, M.W., 1995. Relationship of the time of origin and death of neurons in rat somatosensory cortex: barrel versus septal cortex and projection versus local circuit neurons. *The Journal of comparative neurology* 355, 6-14.
- Miyabara, S., Gropp, A., Winking, H., 1982. Trisomy 16 in the mouse fetus associated with generalized edema and cardiovascular and urinary tract anomalies. *Teratology* 25, 369-380.
- Miyoshi, G., Hjerling-Leffler, J., Karayannis, T., Sousa, V.H., Butt, S.J., Battiste, J., Johnson, J.E., Machold, R.P., Fishell, G., 2010. Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 1582-1594.
- Møller, R.S., Kubart, S., Hoeltzenbein, M., Heye, B., Vogel, I., Hansen, C.P., Menzel, C., Ullmann, R., Tommerup, N., Ropers, H.H., Tumer, Z., Kalscheuer, V.M., 2008.

- Truncation of the Down syndrome candidate gene DYRK1A in two unrelated patients with microcephaly. *American journal of human genetics* 82, 1165-1170.
- Molnar, Z., Adams, R., Goffinet, A.M., Blakemore, C., 1998. The role of the first postmitotic cortical cells in the development of thalamocortical innervation in the reeler mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18, 5746-5765.
- Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R., Macklis, J.D., 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature reviews. Neuroscience* 8, 427-437.
- Moore, C.S., 2006. Postnatal lethality and cardiac anomalies in the Ts65Dn Down syndrome mouse model. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 17, 1005-1012.
- Morgan, J.I., Cohen, D.R., Hempstead, J.L., Curran, T., 1987. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 237, 192-197.
- Mukhopadhyay, A., McGuire, T., Peng, C.Y., Kessler, J.A., 2009. Differential effects of BMP signaling on parvalbumin and somatostatin interneuron differentiation. *Development* 136, 2633-2642.
- Mullen, R.J., Buck, C.R., Smith, A.M., 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201-211.
- Murakami, N., Bolton, D., Hwang, Y.W., 2009. Dyrk1A binds to multiple endocytic proteins required for formation of clathrin-coated vesicles. *Biochemistry* 48, 9297-9305.
- Murakami, N., Xie, W., Lu, R.C., Chen-Hwang, M.C., Wieraszko, A., Hwang, Y.W., 2006. Phosphorylation of amphiphysin I by minibrain kinase/dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase, a kinase implicated in Down syndrome. *The Journal of biological chemistry* 281, 23712-23724.
- Mural, R.J., Adams, M.D., Myers, E.W., Smith, H.O., Miklos, G.L., Wides, R., Halpern, A., Li, P.W., Sutton, G.G., Nadeau, J., Salzberg, S.L., Holt, R.A., Kodira, C.D., Lu, F., Chen, L., Deng, Z., Evangelista, C.C., Gan, W., Heiman, T.J., Li, J., Li, Z., Merkulov, G.V., Milshina, N.V., Naik, A.K., Qi, R., Shue, B.C., Wang, A., Wang, J., Wang, X., Yan, X., Ye, J., Yooseph, S., Zhao, Q., Zheng, L., Zhu, S.C., Biddick, K., Bolanos, R., Delcher, A.L., Dew, I.M., Fasulo, D., Flanigan, M.J., Huson, D.H., Kravitz, S.A., Miller, J.R., Mobarry, C.M., Reinert, K., Remington, K.A., Zhang, Q., Zheng, X.H., Nusskern, D.R., Lai, Z., Lei, Y., Zhong, W., Yao, A., Guan, P., Ji, R.R., Gu, Z., Wang, Z.Y., Zhong, F.,

- Xiao, C., Chiang, C.C., Yandell, M., Wortman, J.R., Amanatides, P.G., Hladun, S.L., Pratts, E.C., Johnson, J.E., Dodson, K.L., Woodford, K.J., Evans, C.A., Gropman, B., Rusch, D.B., Venter, E., Wang, M., Smith, T.J., Houck, J.T., Tompkins, D.E., Haynes, C., Jacob, D., Chin, S.H., Allen, D.R., Dahlke, C.E., Sanders, R., Li, K., Liu, X., Levitsky, A.A., Majoros, W.H., Chen, Q., Xia, A.C., Lopez, J.R., Donnelly, M.T., Newman, M.H., Glodek, A., Kraft, C.L., Nodell, M., Ali, F., An, H.J., Baldwin-Pitts, D., Beeson, K.Y., Cai, S., Carnes, M., Carver, A., Caulk, P.M., Center, A., Chen, Y.H., Cheng, M.L., Coyne, M.D., Crowder, M., Danaher, S., Davenport, L.B., Desilets, R., Dietz, S.M., Doup, L., Dullaghan, P., Ferreira, S., Fosler, C.R., Gire, H.C., Gluecksmann, A., Gocayne, J.D., Gray, J., Hart, B., Haynes, J., Hoover, J., Howland, T., Ibegwam, C., Jalali, M., Johns, D., Kline, L., Ma, D.S., MacCawley, S., Magoon, A., Mann, F., May, D., McIntosh, T.C., Mehta, S., Moy, L., Moy, M.C., Murphy, B.J., Murphy, S.D., Nelson, K.A., Nuri, Z., Parker, K.A., Prudhomme, A.C., Puri, V.N., Qureshi, H., Raley, J.C., Reardon, M.S., Regier, M.A., Rogers, Y.H., Romblad, D.L., Schutz, J., Scott, J.L., Scott, R., Sitter, C.D., Smallwood, M., Sprague, A.C., Stewart, E., Strong, R.V., Suh, E., Sylvester, K., Thomas, R., Tint, N.N., Tsonis, C., Wang, G., Williams, M.S., Williams, S.M., Windsor, S.M., Wolfe, K., Wu, M.M., Zaveri, J., Chaturvedi, K., Gabrielian, A.E., Ke, Z., Sun, J., Subramanian, G., Venter, J.C., Pfannkoch, C.M., Barnstead, M., Stephenson, L.D., 2002. A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome. *Science* 296, 1661-1671.
- Najas, S., 2014. Role of DYRK1A in the development of the cerebral cortex. Implication in Down Syndrome, *Ciències Experimentals i de la Salut*. Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, p. 258.
- Najas, S., Arranz, J., Lochhead, P.A., Ashford, A.L., Oxley, D., Delabar, J.M., Cook, S.J., Barallobre, M.J., Arbones, M.L., 2015. DYRK1A-mediated Cyclin D1 Degradation in Neural Stem Cells Contributes to the Neurogenic Cortical Defects in Down Syndrome. *EBioMedicine* 2, 120-134.
- Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., Kriegstein, A.R., 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature neuroscience* 7, 136-144.
- O'Doherty, A., Ruf, S., Mulligan, C., Hildreth, V., Errington, M.L., Cooke, S., Sesay, A., Modino, S., Vanes, L., Hernandez, D., Linehan, J.M., Sharpe, P.T., Brandner, S., Bliss, T.V., Henderson, D.J., Nizetic, D., Tybulewicz, V.L., Fisher, E.M., 2005. An aneuploid

- mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes. *Science* 309, 2033-2037.
- O'Roak, B.J., Vives, L., Fu, W., Egertson, J.D., Stanaway, I.B., Phelps, I.G., Carvill, G., Kumar, A., Lee, C., Ankenman, K., Munson, J., Hiatt, J.B., Turner, E.H., Levy, R., O'Day, D.R., Krumm, N., Coe, B.P., Martin, B.K., Borenstein, E., Nickerson, D.A., Mefford, H.C., Doherty, D., Akey, J.M., Bernier, R., Eichler, E.E., Shendure, J., 2012b. Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science* 338, 1619-1622.
- O'Roak, B.J., Vives, L., Girirajan, S., Karakoc, E., Krumm, N., Coe, B.P., Levy, R., Ko, A., Lee, C., Smith, J.D., Turner, E.H., Stanaway, I.B., Vernot, B., Malig, M., Baker, C., Reilly, B., Akey, J.M., Borenstein, E., Rieder, M.J., Nickerson, D.A., Bernier, R., Shendure, J., Eichler, E.E., 2012a. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* 485, 246-250.
- Oegema, R., de Klein, A., Verkerk, A.J., Schot, R., Dumeé, B., Douben, H., Eussen, B., Dubbel, L., Poddighe, P.J., van der Laar, I., Dobyns, W.B., van der Spek, P.J., Lequin, M.H., de Coo, I.F., de Wit, M.C., Wessels, M.W., Mancini, G.M., 2010. Distinctive Phenotypic Abnormalities Associated with Submicroscopic 21q22 Deletion Including DYRK1A. *Molecular syndromology* 1, 113-120.
- Okamoto, N., Miya, F., Tsunoda, T., Kato, M., Saitoh, S., Yamasaki, M., Shimizu, A., Torii, C., Kanemura, Y., Kosaki, K., 2015. Targeted next-generation sequencing in the diagnosis of neurodevelopmental disorders. *Clinical genetics* 88, 288-292.
- Okui, M., Ide, T., Morita, K., Funakoshi, E., Ito, F., Ogita, K., Yoneda, Y., Kudoh, J., Shimizu, N., 1999. High-level expression of the Mnb/Dyrk1A gene in brain and heart during rat early development. *Genomics* 62, 165-171.
- Olson, L.E., Richtsmeier, J.T., Leszl, J., Reeves, R.H., 2004b. A chromosome 21 critical region does not cause specific Down syndrome phenotypes. *Science* 306, 687-690.
- Olson, L.E., Roper, R.J., Baxter, L.L., Carlson, E.J., Epstein, C.J., Reeves, R.H., 2004a. Down syndrome mouse models Ts65Dn, Ts1Cje, and Ms1Cje/Ts65Dn exhibit variable severity of cerebellar phenotypes. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 230, 581-589.
- Ori-McKenney, K.M., McKenney, R.J., Huang, H.H., Li, T., Meltzer, S., Jan, L.Y., Vale, R.D., Wiita, A.P., Jan, Y.N., 2016. Phosphorylation of beta-Tubulin by the Down Syndrome

- Kinase, Minibrain/DYRK1a, Regulates Microtubule Dynamics and Dendrite Morphogenesis. *Neuron* 90, 551-563.
- Ortiz-Abalia, J., Sahun, I., Altafaj, X., Andreu, N., Estivill, X., Dierssen, M., Fillat, C., 2008. Targeting Dyrk1A with AAVshRNA attenuates motor alterations in TgDyrk1A, a mouse model of Down syndrome. *American journal of human genetics* 83, 479-488.
- Papavassiliou, P., Charalsawadi, C., Rafferty, K., Jackson-Cook, C., 2015. Mosaicism for trisomy 21: a review. *American journal of medical genetics. Part A* 167A, 26-39.
- Park, J., Chung, K.C., 2013. New Perspectives of Dyrk1A Role in Neurogenesis and Neuropathologic Features of Down Syndrome. *Exp Neurobiol* 22, 244-248.
- Park, J., Song, W.J., Chung, K.C., 2009. Function and regulation of Dyrk1A: towards understanding Down syndrome. *Cell Mol Life Sci* 66, 3235-3240.
- Park, J., Sung, J.Y., Song, W.J., Chang, S., Chung, K.C., 2012. Dyrk1A negatively regulates the actin cytoskeleton through threonine phosphorylation of N-WASP. *J Cell Sci* 125, 67-80.
- Patterson, D., Costa, A.C., 2005. Down syndrome and genetics - a case of linked histories. *Nature reviews. Genetics* 6, 137-147.
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2001. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, Second edition ed, San Diego, CA.
- Pearlson, G.D., Breiter, S.N., Aylward, E.H., Warren, A.C., Grygorcewicz, M., Frangou, S., Barta, P.E., Pulsifer, M.B., 1998. MRI brain changes in subjects with Down syndrome with and without dementia. *Developmental medicine and child neurology* 40, 326.
- Peça, J., Feliciano, C., Ting, J.T., Wang, W., Wells, M.F., Venkatraman, T.N., Lascola, C.D., Fu, Z., Feng, G., 2011. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* 472, 437-442.
- Penzes, P., Buonanno, A., Passafaro, M., Sala, C., Sweet, R.A., 2013. Developmental vulnerability of synapses and circuits associated with neuropsychiatric disorders. *Journal of neurochemistry* 126, 165-182.
- Peñagarikano, O., Abrahams, B.S., Herman, E.I., Winden, K.D., Gdalyahu, A., Dong, H., Sonnenblick, L.I., Gruver, R., Almajano, J., Bragin, A., Golshani, P., Trachtenberg, J.T., Peles, E., Geschwind, D.H., 2011. Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell* 147, 235-246.

- Perea-Bartolomé, M.V., Ladera-Fernández, V., 2004. [Neurofunctional aspects of the thalamus]. *Revista de neurologia* 38, 687-693.
- Pérez-Cremades, D., Hernandez, S., Blasco-Ibanez, J.M., Crespo, C., Nacher, J., Varea, E., 2010. Alteration of inhibitory circuits in the somatosensory cortex of Ts65Dn mice, a model for Down's syndrome. *J Neural Transm* 117, 445-455.
- Petros, T.J., Bultje, R.S., Ross, M.E., Fishell, G., Anderson, S.A., 2015. Apical versus Basal Neurogenesis Directs Cortical Interneuron Subclass Fate. *Cell reports* 13, 1090-1095.
- Pinter, J.D., Eliez, S., Schmitt, J.E., Capone, G.T., Reiss, A.L., 2001a. Neuroanatomy of Down's syndrome: a high-resolution MRI study. *The American journal of psychiatry* 158, 1659-1665.
- Pittler, S.J., Baehr, W., 1991. Identification of a nonsense mutation in the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene of the rd mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 8322-8326.
- Pletcher, M.T., Wiltshire, T., Cabin, D.E., Villanueva, M., Reeves, R.H., 2001. Use of comparative physical and sequence mapping to annotate mouse chromosome 16 and human chromosome 21. *Genomics* 74, 45-54.
- Pons-Espinal, M., Martinez de Lagran, M., Dierssen, M., 2013. Environmental enrichment rescues DYRK1A activity and hippocampal adult neurogenesis in TgDyrk1A. *Neurobiology of disease* 60, 18-31.
- Prandini, P., Deutsch, S., Lyle, R., Gagnebin, M., Delucinge Vivier, C., Delorenzi, M., Gehrig, C., Descombes, P., Sherman, S., Dagna Bricarelli, F., Baldo, C., Novelli, A., Dallapiccola, B., Antonarakis, S.E., 2007. Natural gene-expression variation in Down syndrome modulates the outcome of gene-dosage imbalance. *American journal of human genetics* 81, 252-263.
- Prior, P., Schmitt, B., Grenningloh, G., Pribilla, I., Multhaup, G., Beyreuther, K., Maulet, Y., Werner, P., Langosch, D., Kirsch, J., et al., 1992. Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron* 8, 1161-1170.
- Pritchard, M.A., Kola, I., 1999. The "gene dosage effect" hypothesis versus the "amplified developmental instability" hypothesis in Down syndrome. *Journal of neural transmission. Supplementum* 57, 293-303.

- Rahmani, Z., Blouin, J.L., Creau-Goldberg, N., Watkins, P.C., Mattei, J.F., Poissonnier, M., Prieur, M., Chettouh, Z., Nicole, A., Aurias, A., et al., 1990. Down syndrome critical region around D21S55 on proximal 21q22.3. *Am J Med Genet Suppl* 7, 98-103.
- Ramón y Cajal, S., 1901. Estudios sobre la corteza cerebral humana. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid* 1, 140.
- Redin, C., Gerard, B., Lauer, J., Herenger, Y., Muller, J., Quartier, A., Masurel-Paulet, A., Willems, M., Lesca, G., El-Chehadeh, S., Le Gras, S., Vicaire, S., Philipps, M., Dumas, M., Geoffroy, V., Feger, C., Haumesser, N., Alembik, Y., Barth, M., Bonneau, D., Colin, E., Dollfus, H., Doray, B., Delrue, M.A., Drouin-Garraud, V., Flori, E., Fradin, M., Francannet, C., Goldenberg, A., Lumbroso, S., Mathieu-Dramard, M., Martin-Coignard, D., Lacombe, D., Morin, G., Polge, A., Sukno, S., Thauvin-Robinet, C., Thevenon, J., Doco-Fenzy, M., Genevieve, D., Sarda, P., Edery, P., Isidor, B., Jost, B., Olivier-Faivre, L., Mandel, J.L., Piton, A., 2014. Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high-throughput sequencing. *Journal of medical genetics* 51, 724-736.
- Reeves, R.H., Irving, N.G., Moran, T.H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S.S., Schmidt, C., Bronson, R.T., Davisson, M.T., 1995. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat Genet* 11, 177-184.
- Reinholdt, L.G., Ding, Y., Gilbert, G.J., Czechanski, A., Solzak, J.P., Roper, R.J., Johnson, M.T., Donahue, L.R., Lutz, C., Davisson, M.T., 2011. Molecular characterization of the translocation breakpoints in the Down syndrome mouse model Ts65Dn. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 22, 685-691.
- Richtsmeier, J.T., Zumwalt, A., Carlson, E.J., Epstein, C.J., Reeves, R.H., 2002. Craniofacial phenotypes in segmentally trisomic mouse models for Down syndrome. *Am J Med Genet* 107, 317-324.
- Royer, S., Zemelman, B.V., Losonczy, A., Kim, J., Chance, F., Magee, J.C., Buzsaki, G., 2012. Control of timing, rate and bursts of hippocampal place cells by dendritic and somatic inhibition. *Nature neuroscience* 15, 769-775.
- Ruau, L., Mignot, C., Guet, A., Ohl, C., Nava, C., Heron, D., Keren, B., Depienne, C., Benoit, V., Maystadt, I., Lederer, D., Amsallem, D., Piard, J., 2015. DYRK1A mutations in two unrelated patients. *European journal of medical genetics* 58, 168-174.
- Rubenstein, J.L., 2010. Three hypotheses for developmental defects that may underlie some forms of autism spectrum disorder. *Current opinion in neurology* 23, 118-123.

- Rump, P., Jazayeri, O., van Dijk-Bos, K.K., Johansson, L.F., van Essen, A.J., Verheij, J.B., Veenstra-Knol, H.E., Redeker, E.J., Mannens, M.M., Swertz, M.A., Alizadeh, B.Z., van Ravenswaaij-Arts, C.M., Sinke, R.J., Sikkema-Raddatz, B., 2016. Whole-exome sequencing is a powerful approach for establishing the etiological diagnosis in patients with intellectual disability and microcephaly. *BMC medical genomics* 9, 7.
- Sabbagh, M.N., Fleisher, A., Chen, K., Rogers, J., Berk, C., Reiman, E., Pontecorvo, M., Mintun, M., Skovronsky, D., Jacobson, S.A., Sue, L.I., Liebsack, C., Charney, A.S., Cole, L., Belden, C., Beach, T.G., 2011. Positron emission tomography and neuropathologic estimates of fibrillar amyloid-beta in a patient with Down syndrome and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 68, 1461-1466.
- Sago, H., Carlson, E.J., Smith, D.J., Kilbridge, J., Rubin, E.M., Mobley, W.C., Epstein, C.J., Huang, T.T., 1998. Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6256-6261.
- Sago, H., Carlson, E.J., Smith, D.J., Rubin, E.M., Crnic, L.S., Huang, T.T., Epstein, C.J., 2000. Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome. *Pediatr Res* 48, 606-613.
- Sailani, M.R., Santoni, F.A., Letourneau, A., Borel, C., Makrythanasis, P., Hibaoui, Y., Popadin, K., Bonilla, X., Guipponi, M., Gehrig, C., Vannier, A., Carre-Pigeon, F., Feki, A., Nizetic, D., Antonarakis, S.E., 2015. DNA-Methylation Patterns in Trisomy 21 Using Cells from Monozygotic Twins. *PloS one* 10, e0135555.
- Scales, T.M., Lin, S., Kraus, M., Goold, R.G., Gordon-Weeks, P.R., 2009. Nonprimed and DYRK1A-primed GSK3 beta-phosphorylation sites on MAP1B regulate microtubule dynamics in growing axons. *J Cell Sci* 122, 2424-2435.
- Schmidt-Sidor, B., Wisniewski, K.E., Shepard, T.H., Sersen, E.A., 1990. Brain growth in Down syndrome subjects 15 to 22 weeks of gestational age and birth to 60 months. *Clin Neuropathol* 9, 181-190.
- Sebrie, C., Chabert, C., Ledru, A., Guedj, F., Po, C., Smith, D.J., Rubin, E., Rivals, I., Beloeil, J.C., Gillet, B., Delabar, J.M., 2008. Increased dosage of DYRK1A and brain volumetric alterations in a YAC model of partial trisomy 21. *Anat Rec (Hoboken)* 291, 254-262.
- Seregaza, Z., Roubertoux, P.L., Jamon, M., Soumireu-Mourat, B., 2006. Mouse models of cognitive disorders in trisomy 21: a review. *Behav Genet* 36, 387-404.

- Shapiro, B.L., 2001. Developmental instability of the cerebellum and its relevance to Down syndrome. *Journal of neural transmission. Supplementum*, 11-34.
- Siarey, R.J., Carlson, E.J., Epstein, C.J., Balbo, A., Rapoport, S.I., Galdzicki, Z., 1999. Increased synaptic depression in the Ts65Dn mouse, a model for mental retardation in Down syndrome. *Neuropharmacology* 38, 1917-1920.
- Silberberg, G., Markram, H., 2007. Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells. *Neuron* 53, 735-746.
- Silverman, J.L., Yang, M., Lord, C., Crawley, J.N., 2010. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature reviews. Neuroscience* 11, 490-502.
- Simms, M.L., Kemper, T.L., Timbie, C.M., Bauman, M.L., Blatt, G.J., 2009. The anterior cingulate cortex in autism: heterogeneity of qualitative and quantitative cytoarchitectonic features suggests possible subgroups. *Acta neuropathologica* 118, 673-684.
- Smith, D.J., Stevens, M.E., Sudanagunta, S.P., Bronson, R.T., Makhinson, M., Watabe, A.M., O'Dell, T.J., Fung, J., Weier, H.U., Cheng, J.F., Rubin, E.M., 1997. Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. *Nat Genet* 16, 28-36.
- Sohal, V.S., Zhang, F., Yizhar, O., Deisseroth, K., 2009. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459, 698-702.
- Soppa, U., Schumacher, J., Florencio Ortiz, V., Pasqualon, T., Tejedor, F.J., Becker, W., 2014. The Down syndrome-related protein kinase DYRK1A phosphorylates p27(Kip1) and Cyclin D1 and induces cell cycle exit and neuronal differentiation. *Cell Cycle* 13, 2084-2100.
- Soriano, E., Del Rio, J.A., Martinez, A., Super, H., 1994. Organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. I. Immunocytochemical characterization of neuronal populations in the subplate and marginal zone. *The Journal of comparative neurology* 342, 571-595.
- Souchet, B., Guedj, F., Sahun, I., Duchon, A., Daubigny, F., Badel, A., Yanagawa, Y., Barallobre, M.J., Dierssen, M., Yu, E., Herault, Y., Arbones, M., Janel, N., Creau, N., Delabar, J.M., 2014. Excitation/inhibition balance and learning are modified by Dyrk1a gene dosage. *Neurobiology of disease*.

- Soundararajan, M., Roos, A.K., Savitsky, P., Filippakopoulos, P., Kettenbach, A.N., Olsen, J.V., Gerber, S.A., Eswaran, J., Knapp, S., Elkins, J.M., 2013. Structures of Down syndrome kinases, DYRKs, reveal mechanisms of kinase activation and substrate recognition. *Structure* 21, 986-996.
- Spruston, N., 2008. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature reviews. Neuroscience* 9, 206-221.
- Staudt, T., Lang, M.C., Medda, R., Engelhardt, J., Hell, S.W., 2007. 2,2'-thiodiethanol: a new water soluble mounting medium for high resolution optical microscopy. *Microscopy research and technique* 70, 1-9.
- Steindler, D.A., Colwell, S.A., 1976. Reeler mutant mouse: maintenance of appropriate and reciprocal connections in the cerebral cortex and thalamus. *Brain research* 113, 386-393.
- Stempfle, N., Hutten, Y., Fredouille, C., Brisse, H., Nessmann, C., 1999. Skeletal abnormalities in fetuses with Down's syndrome: a radiographic post-mortem study. *Pediatr Radiol* 29, 682-688.
- Sturgeon, X., Gardiner, K.J., 2011. Transcript catalogs of human chromosome 21 and orthologous chimpanzee and mouse regions. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 22, 261-271.
- Sturgeon, X., Le, T., Ahmed, M.M., Gardiner, K.J., 2012. Pathways to cognitive deficits in Down syndrome. *Progress in brain research* 197, 73-100.
- Sugiyama, T., Osumi, N., Katsuyama, Y., 2013. The germinal matrices in the developing dentate gyrus are composed of neuronal progenitors at distinct differentiation stages. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 242, 1442-1453.
- Sultan, K.T., Brown, K.N., Shi, S.H., 2013. Production and organization of neocortical interneurons. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 221.
- Sungur, A.O., Vorckel, K.J., Schwarting, R.K., Wöhr, M., 2014. Repetitive behaviors in the Shank1 knockout mouse model for autism spectrum disorder: developmental aspects and effects of social context. *Journal of neuroscience methods* 234, 92-100.
- Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Caviness, V.S., Jr., 1993. Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse.

- The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 13, 820-833.
- Takashima, S., Becker, L.E., Armstrong, D.L., Chan, F., 1981. Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study. Brain research 225, 1-21.
- Takashima, S., Ieshima, A., Nakamura, H., Becker, L.E., 1989. Dendrites, dementia and the Down syndrome. Brain & development 11, 131-133.
- Tejedor, F., Zhu, X.R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., Heisenberg, M., Fischbach, K.F., Pongs, O., 1995. minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in Drosophila. Neuron 14, 287-301.
- Thomas, A., Burant, A., Bui, N., Graham, D., Yuva-Paylor, L.A., Paylor, R., 2009. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. Psychopharmacology 204, 361-373.
- Thomazeau, A., Lassalle, O., Iafraiti, J., Souchet, B., Guedj, F., Janel, N., Chavis, P., Delabar, J., Manzoni, O.J., 2014. Prefrontal deficits in a murine model overexpressing the down syndrome candidate gene dyrk1a. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 34, 1138-1147.
- Toyoda, A., Noguchi, H., Taylor, T.D., Ito, T., Pletcher, M.T., Sakaki, Y., Reeves, R.H., Hattori, M., 2002. Comparative genomic sequence analysis of the human chromosome 21 Down syndrome critical region. Genome Res 12, 1323-1332.
- Tremblay, R., Lee, S., Rudy, B., 2016. GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. Neuron 91, 260-292.
- Tuchman, R., Alessandri, M., Cuccaro, M., 2010. Autism spectrum disorders and epilepsy: moving towards a comprehensive approach to treatment. Brain & development 32, 719-730.
- Tuncdemir, S.N., Wamsley, B., Stam, F.J., Osakada, F., Goulding, M., Callaway, E.M., Rudy, B., Fishell, G., 2016. Early Somatostatin Interneuron Connectivity Mediates the Maturation of Deep Layer Cortical Circuits. Neuron 89, 521-535.
- Valetto, A., Orsini, A., Bertini, V., Toschi, B., Bonuccelli, A., Simi, F., Sammartino, I., Taddeucci, G., Simi, P., Saggese, G., 2012. Molecular cytogenetic characterization of an interstitial deletion of chromosome 21 (21q22.13q22.3) in a patient with dysmorphic

- features, intellectual disability and severe generalized epilepsy. *European journal of medical genetics* 55, 362-366.
- Valverde, F., 2002. [Structure of the cerebral cortex. Intrinsic organization and comparative analysis of the neocortex]. *Revista de neurologia* 34, 758-780.
- van Bon, B.W., Coe, B.P., Bernier, R., Green, C., Gerds, J., Witherspoon, K., Kleefstra, T., Willemsen, M.H., Kumar, R., Bosco, P., Fichera, M., Li, D., Amaral, D., Cristofoli, F., Peeters, H., Haan, E., Romano, C., Mefford, H.C., Scheffer, I., Gecz, J., de Vries, B.B., Eichler, E.E., 2015b. Disruptive de novo mutations of DYRK1A lead to a syndromic form of autism and ID. *Molecular psychiatry*.
- van Bon, B.W., Hoischen, A., Hehir-Kwa, J., de Brouwer, A.P., Ruivenkamp, C., Gijbbers, A.C., Marcelis, C.L., de Leeuw, N., Veltman, J.A., Brunner, H.G., de Vries, B.B., 2011. Intragenic deletion in DYRK1A leads to mental retardation and primary microcephaly. *Clinical genetics* 79, 296-299.
- van Bon, B.W.M., Coe, B.P., de Vries, B.B.A., Eichler, E.E., 2015a. DYRK1A-Related Intellectual Disability Syndrome, in: Pagon, R.A., Adam, M.P., Ardinger, H.H., Wallace, S.E., Amemiya, A., Bean, L.J.H., Bird, T.D., Fong, C.T., Mefford, H.C., Smith, R.J.H., Stephens, K. (Eds.), *GeneReviews(R)*, Seattle (WA).
- Wechsler, J., Greene, M., McDevitt, M.A., Anastasi, J., Karp, J.E., Le Beau, M.M., Crispino, J.D., 2002. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet* 32, 148-152.
- Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Frackowiak, J., Dowjat, K., Silverman, W.P., Reisberg, B., DeLeon, M., Wisniewski, T., Adayev, T., Chen-Hwang, M.C., Hwang, Y.W., 2004. Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain. *Brain research* 1010, 69-80.
- Welagen, J., Anderson, S., 2011. Origins of neocortical interneurons in mice. *Dev Neurobiol* 71, 10-17.
- Williams, A.D., Mjaatvedt, C.H., Moore, C.S., 2008. Characterization of the cardiac phenotype in neonatal Ts65Dn mice. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237, 426-435.
- Wilson, N.R., Runyan, C.A., Wang, F.L., Sur, M., 2012. Division and subtraction by distinct cortical inhibitory networks in vivo. *Nature* 488, 343-348.

- Winter, T.C., Ostrovsky, A.A., Komarniski, C.A., Uhrich, S.B., 2000. Cerebellar and frontal lobe hypoplasia in fetuses with trisomy 21: usefulness as combined US markers. *Radiology* 214, 533-538.
- Wisniewski, K.E., 1990. Down syndrome children often have brain with maturation delay, retardation of growth, and cortical dysgenesis. *American journal of medical genetics. Supplement* 7, 274-281.
- Wonders, C.P., Taylor, L., Welagen, J., Mbata, I.C., Xiang, J.Z., Anderson, S.A., 2008. A spatial bias for the origins of interneuron subgroups within the medial ganglionic eminence. *Dev Biol* 314, 127-136.
- Wulff, P., Ponomarenko, A.A., Bartos, M., Korotkova, T.M., Fuchs, E.C., Bahner, F., Both, M., Tort, A.B., Kopell, N.J., Wisden, W., Monyer, H., 2009. Hippocampal theta rhythm and its coupling with gamma oscillations require fast inhibition onto parvalbumin-positive interneurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 3561-3566.
- Wurzman, R., Forcelli, P.A., Griffey, C.J., Kromer, L.F., 2015. Repetitive grooming and sensorimotor abnormalities in an ephrin-A knockout model for Autism Spectrum Disorders. *Behavioural brain research* 278, 115-128.
- Yamaguchi, Y., Miura, M., 2015. Programmed cell death in neurodevelopment. *Developmental cell* 32, 478-490.
- Yamamoto, M., Boyer, A.M., Crandall, J.E., Edwards, M., Tanaka, H., 1986. Distribution of stage-specific neurite-associated proteins in the developing murine nervous system recognized by a monoclonal antibody. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 6, 3576-3594.
- Yamamoto, T., Shimojima, K., Nishizawa, T., Matsuo, M., Ito, M., Imai, K., 2011. Clinical manifestations of the deletion of Down syndrome critical region including DYRK1A and KCNJ6. *American journal of medical genetics. Part A* 155A, 113-119.
- Yang, Q., Rasmussen, S.A., Friedman, J.M., 2002. Mortality associated with Down's syndrome in the USA from 1983 to 1997: a population-based study. *Lancet* 359, 1019-1025.
- Yu, T., Clapcote, S.J., Li, Z., Liu, C., Pao, A., Bechard, A.R., Carattini-Rivera, S., Matsui, S., Roder, J.C., Baldini, A., Mobley, W.C., Bradley, A., Yu, Y.E., 2010c. Deficiencies in the

region syntenic to human 21q22.3 cause cognitive deficits in mice. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 21, 258-267.

Yu, T., Li, Z., Jia, Z., Clapcote, S.J., Liu, C., Li, S., Asrar, S., Pao, A., Chen, R., Fan, N., Carattini-Rivera, S., Bechard, A.R., Spring, S., Henkelman, R.M., Stoica, G., Matsui, S., Nowak, N.J., Roder, J.C., Chen, C., Bradley, A., Yu, Y.E., 2010b. A mouse model of Down syndrome trisomic for all human chromosome 21 syntenic regions. *Human molecular genetics* 19, 2780-2791.

Yu, T., Liu, C., Belichenko, P., Clapcote, S.J., Li, S., Pao, A., Kleschevnikov, A., Bechard, A.R., Asrar, S., Chen, R., Fan, N., Zhou, Z., Jia, Z., Chen, C., Roder, J.C., Liu, B., Baldini, A., Mobley, W.C., Yu, Y.E., 2010a. Effects of individual segmental trisomies of human chromosome 21 syntenic regions on hippocampal long-term potentiation and cognitive behaviors in mice. *Brain research* 1366, 162-171.

ANEXO



Contents lists available at ScienceDirect

EBioMedicine

journal homepage: www.ebiomedicine.com



DYRK1A-mediated Cyclin D1 Degradation in Neural Stem Cells Contributes to the Neurogenic Cortical Defects in Down Syndrome



Sònia Najas^a, Juan Arranz^a, Pamela A. Lochhead^b, Anne L. Ashford^b, David Oxley^c, Jean M. Delabar^d, Simon J. Cook^b, María José Barallobre^a, Maria L. Arbonés^{a,*}

^a Department of Developmental Biology, Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), 08028 Barcelona, Spain

^b Signalling Programme, The Babraham Institute, Babraham Research Campus, CB22 3AT Cambridge, UK

^c Proteomics Group, The Babraham Institute, Babraham Research Campus, CB22 3AT Cambridge, UK

^d Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Inserm, CNRS, UM 75, U 1127, UMR 7225, ICM, 75013 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 August 2014
Received in revised form 16 January 2015
Accepted 16 January 2015
Available online 17 January 2015

Keywords:

Cell cycle regulation
DYRK kinases
Cerebral cortex development
Trisomy 21
Neurodevelopmental disorders
Intellectual disability

ABSTRACT

Alterations in cerebral cortex connectivity lead to intellectual disability and in Down syndrome, this is associated with a deficit in cortical neurons that arises during prenatal development. However, the pathogenic mechanisms that cause this deficit have not yet been defined. Here we show that the human DYRK1A kinase on chromosome 21 tightly regulates the nuclear levels of Cyclin D1 in embryonic cortical stem (radial glia) cells, and that a modest increase in DYRK1A protein in transgenic embryos lengthens the G1 phase in these progenitors. These alterations promote asymmetric proliferative divisions at the expense of neurogenic divisions, producing a deficit in cortical projection neurons that persists in postnatal stages. Moreover, radial glial progenitors in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome have less Cyclin D1, and *Dyrk1a* is the triplicated gene that causes both early cortical neurogenic defects and decreased nuclear Cyclin D1 levels in this model. These data provide insights into the mechanisms that couple cell cycle regulation and neuron production in cortical neural stem cells, emphasizing that the deleterious effect of *DYRK1A* triplication in the formation of the cerebral cortex begins at the onset of neurogenesis, which is relevant to the search for early therapeutic interventions in Down syndrome.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The mammalian neocortex is the brain region responsible for cognitive function, sensory perception and consciousness. It is formed by many types of neurons and glial cells, all of which are distributed across six histologically defined layers that are generated in a spatially and temporally-regulated manner thanks to the interplay of intrinsic molecular programs and extracellular cues (Tiberi et al., 2012). Impaired development of this brain structure has been associated with mental deficiency and other major neurological disorders (Lewis and Sweet, 2009; Rubenstein, 2010; Sun and Hevner, 2014).

Around 80% of neocortical neurons are excitatory projection neurons that extend axons to distant intracortical targets and to subcortical regions, whilst the remainder are inhibitory interneurons involved in local circuits (DeFelipe et al., 2013; Greig et al., 2013). The distinct

types of projection neurons are produced in the dorsolateral telencephalon (*pallium*) of the embryo from multipotent neural stem cells (NSCs) known as radial glia (RG), and from more restricted progenitors, the intermediate progenitors (IPs). These neurons are generated in an inside-outside pattern, first generating the neurons that form the layer closest to the ventricle (layer VI) and lastly those that form the most superficial layers (Layers II–III). Projection neurons within a layer have common molecular characteristics and connectivity patterns, which they acquire at their birth (Greig et al., 2013; Molyneaux et al., 2007).

During neurogenesis, RG progenitors divide asymmetrically in the ventricular zone (VZ) producing another RG cell and either a neuron or an IP (Noctor et al., 2004; Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004). This progenitor moves to a more basal proliferative layer, the subventricular zone (SVZ), where it divides symmetrically to produce a pair of neurons directly or it does so after 1 to 3 rounds of symmetric amplifying divisions (Noctor et al., 2004; Kowalczyk et al., 2009). Consequently, as neocortical development progresses and the cellularity in the SVZ increases, IPs become the major source of projection neurons (Breunig et al., 2011; Kowalczyk et al., 2009). According to this model, the number and proportion of projection neuron subtypes in a cortical radial column are related to the number of RG progenitors that are

Abbreviations: DS, Down syndrome; IP, intermediate progenitor; NSC, neural stem cell; RG, radial glia; SVZ, subventricular zone; VZ, ventricular zone

* Corresponding author at: Instituto de Biología Molecular de Barcelona (CSIC), Parc Científic de Barcelona, C/Baldiri Reixac 4-8, 08028 Barcelona, Spain.

E-mail address: mariona.arbones@ibmb.csic.es (M.L. Arbonés).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.01.010>

2352-3964/© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

present at the onset of neurogenesis, as well as to the number of VZ (apical) and SVZ (basal) proliferative and neurogenic divisions (Huttner and Kosodo, 2005; Noctor et al., 2001, 2007).

Regulation of the cell cycle, and particularly of the G1 phase of the cell cycle, is important for the normal expansion of the neocortex in both rodents and primates (Dehay and Kennedy, 2007). G1 is a critical phase, integrating extracellular signals that induce either commitment to a further round of cell division, or withdrawal from the cell cycle and differentiation (Cunningham and Roussel, 2001; Dehay and Kennedy, 2007; Salomoni and Calegari, 2010; Zetterberg et al., 1995). Pioneering cumulative S-phase labelling experiments performed in the mouse embryo showed that as neurogenesis progresses the cell cycle of neocortical progenitors extends due to a progressive lengthening of the G1 phase (Takahashi et al., 1995). Moreover, there is evidence of a correlation between cell cycle length and neurogenesis, which has led to the formulation of the cell cycle length hypothesis (Gotz and Huttner, 2005). According to this hypothesis, the time that a progenitor spends in G1 determines the final effect of a particular cell fate determinant, which could be equivalent (symmetric divisions) or distinct (asymmetric divisions) in the two daughter cells (Dehay and Kennedy, 2007; Gotz and Huttner, 2005; Salomoni and Calegari, 2010). Indeed, it was more recently shown that manipulating the duration of the G1 phase in neocortical apical progenitors alters the production of IPs and neurons (Lange et al., 2009; Pilaz et al., 2009).

Down syndrome (DS), the most common genetic cause of intellectual disability, is caused by trisomy of chromosome 21. DS brains are smaller than normal brains and they exhibit neuronal deficits in several regions, including the cerebral cortex (Ross et al., 1984). Infants with DS also present hypocellularity in this brain structure (Schmidt-Sidor et al., 1990; Wisniewski, 1990), indicating that defects in prenatal development are a major determinant of the deficit in adults. Indeed, fewer cells (Larsen et al., 2008) and disorganized laminae are evident in the cerebral cortex of DS fetuses from as early as the second trimester of gestation (Golden and Hyman, 1994).

The availability of DS mouse models in which different regions of chromosome 21 are in trisomy (Haydar and Reeves, 2012; Liu et al., 2011) has allowed the effect of trisomic genes on prenatal development to be assessed, assigning phenotypic aspects of the syndrome to a region of chromosome 21. In the best studied model of DS, the Ts65Dn mouse (Reeves et al., 1995), the growth of the neocortical wall is delayed due to the impaired production of neurons early in neurogenesis that is concomitant with a lengthening of the cell cycle in the ventricular germinal layer (Chakrabarti et al., 2007). The Ts1Cje mouse is a DS model with a smaller trisomic region than the Ts65Dn mouse (Haydar and Reeves, 2012), yet it also develops an abnormally thin neocortex and slower cell cycle exit is observed during embryogenesis (Ishihara et al., 2010). Importantly, the proliferation markers expressed in the neocortical germinal matrix of DS fetuses also suggest cell cycle defects which underpin the reduced neuron production (Contestabile et al., 2007). There are around 80 genes in the triplicated segment common to Ts65Dn and Ts1Cje mice, which contains the DS critical region (DSCR) of chromosome 21 (Delabar et al., 1993; Toyoda et al., 2002). Thus, it is likely that dosage imbalance of one or a few genes in this region contributes to the deficit of cortical neurons in DS.

In this study we have assessed the possibility that triplication of *DYRK1A*, a DSCR gene, contributes to the hypocellularity of the cerebral cortex associated with DS. *DYRK1A* (dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A) encodes a constitutively active kinase that phosphorylates serine and threonine residues in a variety of substrates (Becker and Sippl, 2011). In humans, truncating mutations in the *DYRK1A* gene cause primary microcephaly (Courcet et al., 2012) and autism (O'Roak et al., 2012). Moreover, mice and flies with haploinsufficiency of the *Dyrk1a/minibrain* genes have smaller brains (Fotaki et al., 2002; Tejedor et al., 1995), indicating that the role of *DYRK1A* in brain growth is conserved across evolution. Experiments on neural progenitors derived from induced pluripotent stem cells

from monozygotic twins discordant for trisomy 21 highlight *DYRK1A* as one of the chromosome 21 genes important for the proliferation and differentiation defects associated with DS (Hibaoui et al., 2014). However, despite the evidence from different model systems showing that *DYRK1A* regulates neural proliferation and differentiation (Tejedor and Hammerle, 2011), the pathogenic effects of *DYRK1A* overexpression in the formation of brain circuits in DS remain unclear (Haydar and Reeves, 2012).

The effect of *DYRK1A* overexpression on cortical neurogenesis has been assessed in the mouse embryo through electroporation, although the results obtained were inconclusive. The ectopic overexpression of *DYRK1A* in progenitors of the dorsal telencephalon induced proliferation arrest (Hammerle et al., 2011; Yabut et al., 2010), provoking premature neuronal differentiation (Yabut et al., 2010), a phenotype that is quite opposite to the growth delay of the cortical wall observed in the Ts65Dn embryos (Chakrabarti et al., 2007). These studies involved electroporation at mid-corticogenesis stages and the levels of *DYRK1A* overexpression were not controlled. More recent experiments showed that modest *DYRK1A* overexpression does not disturb the birth of cortical neurons when induced at the onset of neurogenesis (Kurabayashi and Sanada, 2013). Thus, the effect of *DYRK1A* on cortical neurogenesis seems to depend on the time and/or the level of overexpression.

Using mouse models that overexpress *Dyrk1a* under its endogenous regulatory sequences, mimicking the situation in DS, we now demonstrate that trisomy of *Dyrk1a* is sufficient to lengthen the G1 phase of the cell cycle and to bias the production of RG-derived neurons and IPs during the early phase of corticogenesis, and that the triplication of the *Dyrk1a* gene is necessary for dampened early neurogenesis in the developing neocortex of Ts65Dn embryos.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

In this study we have used embryos and postnatal *Dyrk1a*^{+/-} mice, mBACTg*Dyrk1a* mice, Ts65Dn mice and their respective wild-type littermates, as well as the mice resulting from crosses between Ts65Dn females and *Dyrk1a*^{+/-} males. The day of the vaginal plug was defined as E0.5, and the day of birth was defined as P0.

The generation of Ts65Dn mice, *Dyrk1a*^{+/-} mice and mBACTg*Dyrk1a* mice was described elsewhere (Davisson et al., 1993; Fotaki et al., 2002; Guedj et al., 2012). Mice were maintained in their original genetic backgrounds: *Dyrk1a*^{+/-} mice by repeated backcrossing of *Dyrk1a*^{+/-} males to C57BL/6Jx129S2/SvHsd F1 females (Harlan Laboratories); mBACTg*Dyrk1a* mice by repeated backcrossing of transgenic males to C57BL/6J females (Charles River Laboratories); and Ts65Dn mice by repeated backcrossing of parental Ts65Dn females (Jackson Laboratory, USA) to B6EiC3 males (Harlan laboratories). *Dyrk1a*^{+/-} and mBACTg*Dyrk1a* mice were genotyped by PCR (Fotaki et al., 2002; Guedj et al., 2012) and Ts65Dn mice by PCR (Reinholdt et al., 2011) or by quantitative PCR (<http://www.jax.org/cyto/quantpcr.html>).

All the experimental procedures were carried out in accordance with the European Union guidelines (Directive 2010/63/EU) and the followed protocols were approved by the ethics committee of the Parc Científic de Barcelona (PCB).

2.2. Tissue Preparation for Histology

To obtain embryonic tissue, whole heads were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde (PFA) for 24 h at 4 °C, cryoprotected with 30% sucrose in PBS, embedded in Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek), frozen in isopentane at -30 °C and sectioned on a cryostat. Cryosections (14 µm) were collected on Starfrost precoated slides (Knittel Glasser) and distributed serially. Postnatal P0 and P7 mice were deeply anaesthetized in a CO₂ chamber and transcardially perfused with 4% PFA.

The brains were removed, post-fixed and cryoprotected as indicated above, and cryotome (40 μm) sections were then distributed serially. For DYRK1A and PDGFR α immunostainings in embryos, the post-fixed brains were embedded in 2% agarose and sectioned directly on a vibratome (40 μm).

2.3. Immunostainings and Cell Counts

For accurate immunostaining with some antibodies (see Supplementary information) it was necessary to perform an antigen retrieval treatment before blocking: sections were boiled for 10 min in sodium citrate buffer (2 mM citric acid monohydrate, 8 mM tri-sodium citrate dihydrate, pH 6.0). For BrdU immunostaining, sections were incubated before blocking in 50% formamide in $2 \times \text{SSC}$ at 64 °C for 10 min followed by an incubation in 2 N HCL at 37 °C for 30 min and finally 10 min in 0.1 M boric acid (pH 8.5) at room temperature (RT). The sections were blocked for 1 h at RT in PBS containing 0.2% Triton-X100 and 10% foetal bovine serum (FBS) and probed for 12 to 48 h at 4 °C with the primary antibodies diluted in antibody buffer (AB: PBS containing 0.2% Triton-X100 and 5% FBS). Sections were washed and primary antibodies detected by using Alexa-555 and Alexa-488 conjugated secondary antibodies (1:1,000; Life Technologies). Cell nuclei were stained with Hoechst (Sigma-Aldrich). For antibodies against BrdU and Pax6, and against Cyclin D1 (in E13.5, E16.5 and E18.5 brain sections) signal amplification was required: after washing primary antibodies, sections were incubated with the corresponding biotinylated secondary antibody (1:200; Vector Labs), washed and incubated with Alexa-488 conjugated streptavidin (Life Technologies). In all cases, the specificity of the immunoreaction was tested by omitting the primary antibody. A complete list of the primary antibodies can be found in Supplementary data.

Images were taken using the Leica TCS SP5 confocal microscope or the Leica AF7000 motorized wide-field microscope. Labelled cells in embryonic sections were counted in a 100 μm -wide column of the lateral cortical wall, with the exception of cleaved-caspase3⁺ cells that were counted in a 400 μm -wide column at E11.5 and in 1400 μm width column at E14.5, and pH3⁺ cells, Olig2⁺ cells and EdU-labelled cells that were counted in 600 μm -, 300 μm - and 250 μm -wide columns, respectively. Labelled cells in postnatal sections were counted in a wide column of 350 μm in Fig. 6B and in a wide column of 200 μm in Fig. 7D and Supplementary Figs. 9 and 12. All cell counts were blind and performed in a minimum of 3 sections of the same rostro-caudal level per embryo or mice.

2.4. Measurements of Cytoplasmic and Nuclear Cyclin D1

Relative cytoplasmatic and nuclear Cyclin D1 protein levels were estimated in confocal images of brain sections stained for Cyclin D1 and the nuclei labelled with Hoechst. First, images were converted to binary images by applying a threshold level on them using the Image-J software. Cytoplasmatic Cyclin D1 was assigned to the Cyclin D1 signal that did not overlap with the Hoechst signal and was obtained by subtracting the Hoechst binary image to the Cyclin D1 binary image. Nuclear Cyclin D1 corresponded to the Cyclin D1 signal that overlapped with the Hoechst signal and was obtained by subtracting the cytoplasmatic Cyclin D1 binary image to the total Cyclin D1 binary image (see Supplementary Fig. 2C and D). Labelling intensities of total, nuclear and cytoplasmatic Cyclin D1 were obtained in each image using the integrated density option of the Image-J software. Cyclin D1 measurements were done in the medial region of the dorso-lateral VZ within a rectangle of 250 $\mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ in E11.5 and E13.5 sections or in a rectangle of 250 $\mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ in E16.5 sections. As a consequence of the interkinetic nuclear movement of RG progenitors (Gotz and Huttnner, 2005), the majority of progenitors with their nuclei in the intermediate VZ region should be in G1 or in G2.

2.5. Cell Cycle Exit Rates and Cell Cycle Parameters

For cell cycle exit rate quantifications, pregnant females were intra-peritoneally injected with one pulse of BrdU (100 mg/kg; Sigma) and sacrificed 24 h later. Embryos were collected and processed as describe above. Sections were immunostained for BrdU and Tbr1 (E12.5 embryos) or for BrdU and Ki67 (E14.5 embryos). Neuronal production was estimated in E12.5 embryo sections counting the proportion of BrdU immunolabelled cells that were Tbr1⁺. Cell cycle exit rates were estimated in E14.5 embryo sections counting the proportion of BrdU immunolabelled cells that were negative for Ki67.

Cell cycle duration of radial glial progenitors was measured *in vivo* following the S-phase cumulative EdU labelling protocol described by Arai et al. (2011). Briefly, pregnant females (E11.5) were repeatedly injected with EdU (3.3 mg/kg; Life Technologies), every hour for the first five injections and every 2 h for the remaining ones, and sacrificed at different time points according to the schedule shown in Fig. 2A. Embryos were post-fixed, cryoprotected and cryosectioned as described before. EdU was detected in coronal sections using the Click-iT EdU Alexa Fluor 647 kit (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. EdU cell counts were performed in a 250 μm -wide field of the dorsolateral wall in a minimum of 3 sections per embryo. The proportion of Hoechst-stained nuclei in the VZ that were EdU⁺, Tuj1⁻ and Tbr2⁻ at the different times of cumulative labelling (labelling index) were plotted (see Fig. 2C) as described previously (Nowakowski et al., 1989; Takahashi et al., 1995) to estimate the growth fraction, GF (fraction of cells that are proliferating and that correspond to the maximum labelling index); the cell cycle duration, Tc; and the S-phase duration, Ts. Tc and Ts were calculated taking into account the Tc-Ts value, which is the cumulative labelling time required to achieve the maximum labelling index, and the Ts/Tc value was given by the intersection of the extrapolation of the linear regression line to the Y axis. To generate the best fitted-regression lines we applied the Linear Regression Model of the Prism software (version 5; GraphPad software) to the averaged labelling indexes of the time points before reaching the GF. The slopes of the best-fitted lines in wild-type and TgDyrk1a samples were analysed for statistical significance with the same software.

For estimating duration of G2 and M phases, sections from embryos exposed to EdU for 1, 2 or 3 h were immunostained against pH3 to identify mitotic progenitors and EdU visualized as before. Mitotic progenitors at the apical surface were counted in a 250 μm -wide field in a minimum of 3 sections per embryo. G2 duration was considered as the time required for half-maximal appearance of EdU in mitotic progenitors (see Fig. 2D), and M phase duration to the proportion of VZ progenitors that were in mitosis (pH3⁺ cells) multiply to the total cell cycle duration as described in Arai et al. (2011). All these values were then used to calculate the duration of G1 phase.

2.6. Western Blotting

Total protein extracts ($\approx 40 \mu\text{g}$) were resolved by SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, Amersham Biosciences) or Immobilon P membranes (Millipore) that was probed with antibodies whose binding was detected by infrared fluorescence using the LI-COR Odyssey IR Imaging System V3.0 (LI-COR Biosciences) or by chemiluminescence using the Amersham ECLTM Western blotting detection reagent (Amersham Life Sciences) and X-ray Films (AGFA). Primary antibodies used were: mouse monoclonal anti-DYRK1A (1:500; Abnova Corporation or 1:1000; Santa Cruz), anti-p27 (1:500; BD Biosciences), anti-p21 (1:200; Santa Cruz), anti-vinculin (1:5000; Sigma-Aldrich) and anti-Cyclin D1 (1:200, Calbiochem); rabbit polyclonal anti-Cyclin D1 (1:2,000; Thermo Scientific), anti-actin (1:5000; Sigma-Aldrich), anti-retinoblastoma (1:500; BD Biosciences), anti-HSP90 (1:2000; BD Biosciences), anti-pT286-cyclin D1 (1:500; Cell Signalling), anti-GFP (1:1000, Roche) and anti-RCAN1 (1:1000).

Polyclonal HA antibody conjugated to agarose beads was from Santa Cruz. Secondary antibodies for infrared fluorescent detection were goat anti-mouse IgG IRDye-800CW and goat anti-rabbit IgG IRDye-680CW, and for chemiluminescence detection were rabbit anti-mouse and goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (1:2000; Dako).

2.7. RNA Extraction and Real-time qPCR

Total RNA from the telencephalon of E10.5 and E11.5 embryos were extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions and the eluted RNA treated with DNase (Ambion) for 30 min at 37 °C. cDNAs were synthesized from 1 µg of total RNA using Superscript II retrotranscriptase (Life Technologies) and random hexamers (Life Technologies). Real-time qPCR was carried out with the Lightcycler 480 platform (Roche) using SYBR Green I Master Kit (Roche). *Peptidyl-prolyl isomerase A (Ppia)* was used as reference gene for data normalization. A complete list of the primers used can be found in Supplementary data.

2.8. Statistical Analysis

Data are presented as the mean ± S.E.M. and were analysed by the two-tailed Student's t-test with the exception of the EdU labelling index data that was analysed as indicated before with the Linear Regression Model of the Prism software. A minimum of three embryos or mice of the same genotype was analysed in each experiment. Differences were considered significant at p-values < 0.05: *p < 0.05, **p < 0.001 and ***p < 0.0001.

3. Results

3.1. Neocortical RG Progenitors in *TgDyrk1a* Embryos Have Reduced Levels of Nuclear Cyclin D1

During the neurogenic phase of neocortical development, DYRK1A is expressed in progenitors of the VZ (Pax6⁺ cells) as well as in progenitors of the SVZ (Tbr2⁺ cells) (Supplementary Fig. 1). As ectopic overexpression of DYRK1A induces cell cycle exit in neural cells (Park et al., 2010; Yabut et al., 2010), we asked whether triplication of *Dyrk1a* gene is sufficient to affect the expression of cell cycle regulators in cortical neural progenitors *in vivo*. To this end, we used a transgenic mouse model, the mBACtgDyrk1a mouse (*TgDyrk1a* hereafter), which carries in a BAC the whole *Dyrk1a* gene (Guedj et al., 2012). There is evidence showing that DYRK1A can induce cell cycle exit in neural progenitors by different means; promoting the nuclear export and degradation of the cell cycle activator Cyclin D1 (Yabut et al., 2010), inducing the expression of the Cdk inhibitors *p27^{KIP1}* (Hammerle et al., 2011) and *p21^{CIP1}* (Park et al., 2010), and promoting the stabilization of *p27^{KIP1}* protein (Soppa et al., 2014). Therefore, we compared the mRNA and protein levels of these cell cycle regulators in the telencephalon of wild-type and *TgDyrk1a* embryos at the beginning of neurogenesis (E11.5), which is mainly formed by the germinal VZ (see Supplementary Fig. 1A). Consistent with the genetic complement, *Dyrk1a* mRNA and protein levels were increased (1.5–1.7 fold) in the telencephalon of transgenic embryos when compared to the wild-type (Fig. 1A and B). mRNA and protein levels of the cell cycle regulators examined were the same in both genotypes with the exception of Cyclin D1 protein levels that were decreased in the *TgDyrk1a* embryos (Fig. 1A and B). Similarly, E10.5 *TgDyrk1a* whole embryos exhibited reduced Cyclin D1 protein levels but normal levels of Cyclin D1, *p27^{KIP1}* and *p21^{CIP1}* mRNA transcripts (Supplementary Fig. 2A and B). Thus, a 1.5-fold increase in DYRK1A at the beginning of neurogenesis diminished Cyclin D1 protein content in the mouse embryo irrespective of the cell type. We also performed immunostaining for Cyclin D1 and found that the levels of Cyclin D1 in the nuclei of RG

progenitors were significantly decreased in E11.5 *TgDyrk1a* embryos (Fig. 1C and Supplementary Fig. 2C and D).

One of the main nuclear functions of Cyclin D1 is to promote G1-to-S phase transition through association with and activation of Cdk4/6. This leads to the phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb), which promotes the release of E2F transcription factor from the pRb/E2F complex and the expression of genes necessary for cell cycle progression (Cunningham and Roussel, 2001). Consistent with the decreased levels of nuclear Cyclin D1 (Fig. 1C), the relative amount of hyperphosphorylated Rb in the telencephalon of E11.5 *TgDyrk1a* embryos was lower than in the wild-types (Fig. 1D), indicating that a 1.5-fold increase in DYRK1A is sufficient to reduce Cyclin D-Cdk activity in telencephalic RG progenitors at the onset of neurogenesis.

Nuclear export of Cyclin D1 and its subsequent degradation via the ubiquitin-proteasome pathway requires the phosphorylation of Cyclin D1 at threonine 286 (T286) (Diehl et al., 1997). Whilst glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3β) was thought to be the only kinase responsible for phosphorylating Cyclin D1 on T286 (Diehl et al., 1998), the demonstration that DYRK1A could promote the nuclear export and turnover of Cyclin D1 in Neuro2a progenitor cells (Yabut et al., 2010) raised the possibility that DYRK1A might also be a 'T286 kinase', providing a mechanism for the reduction in Cyclin D1 levels. However, since the class I DYRKs (DYRK1A and DYRK1B) can also act as priming kinases for GSK3β, attribution of DYRK1A as a T286 kinase requires careful mapping of phosphorylation *in vitro* and *in vivo*. Indeed, we recently showed unambiguously that DYRK1B was able to phosphorylate Cyclin D1 directly at T286 *in vitro* and in cells independently of GSK3β (Ashford et al., 2014). Here we applied the same analysis to determine if DYRK1A could phosphorylate Cyclin D1 at T286. First, using [γ -³²P] ATP in *in vitro* kinase reactions, we found that recombinant DYRK1A could phosphorylate purified recombinant wild-type Cyclin D1 but not Cyclin D1-T286A (Supplementary Fig. 3A). Second, recombinant wild-type Cyclin D1 that was phosphorylated by DYRK1A in these *in vitro* reactions was detected by a phospho-specific pT286 antibody whereas Cyclin D1-T286A was not (Supplementary Fig. 3B). These results demonstrated that DYRK1A could directly phosphorylate Cyclin D1 at T286 *in vitro*. To assess whether DYRK1A could also promote pT286 in cells we co-expressed DYRK1A and Cyclin D1 in HEK293 cells and mapped phosphorylation by mass spectrometry. As with DYRK1B previously (Ashford et al., 2014), we detected only a single phospho-peptide and this was phosphorylated at T286 (Supplementary Fig. 3C). Consistent with this, co-expression of DYRK1A and Cyclin D1 promoted phosphorylation of Cyclin D1 at T286 as detected by the pT286 antibody (Supplementary Fig. 3D). Finally, a catalytically inactive mutant of DYRK1A (KD, kinase dead, K188R) failed to promote pT286 and the pT286 antibody failed to detect DYRK1A-driven phosphorylation of Cyclin D1-T286A in cells (Supplementary Fig. 3E). These results confirm and extend published work (Chen et al., 2013; Soppa et al., 2014) and show that as with DYRK1B (Ashford et al., 2014) DYRK1A is a bona fide Cyclin D1 kinase that can phosphorylate T286.

The mouse *Cyclin D1* gene, like its human counterpart, expresses two spliced mRNA variants (Wu et al., 2009); one encodes the canonical Cyclin D1 isoform that contains T286 in its carboxy-terminus, and the other encodes a longer protein isoform with a distinct carboxy-terminal domain that lacks the phosphorylation consensus sequence for DYRK kinases. We could not directly assess Cyclin D1 phosphorylation in *TgDyrk1a* embryos because pT286 antibodies failed to detect endogenous phosphorylated Cyclin D1. However, our immunofluorescence and Western blot results showed reduced levels of nuclear Cyclin D1 and the specific loss of the shorter Cyclin D1 isoform bearing T286 (Fig. 1B–C and Supplementary Fig. 2B) in *TgDyrk1a* embryos, strongly suggesting that DYRK1A phosphorylates T286 in Cyclin D1 *in vivo* to regulate Cyclin D1 levels.

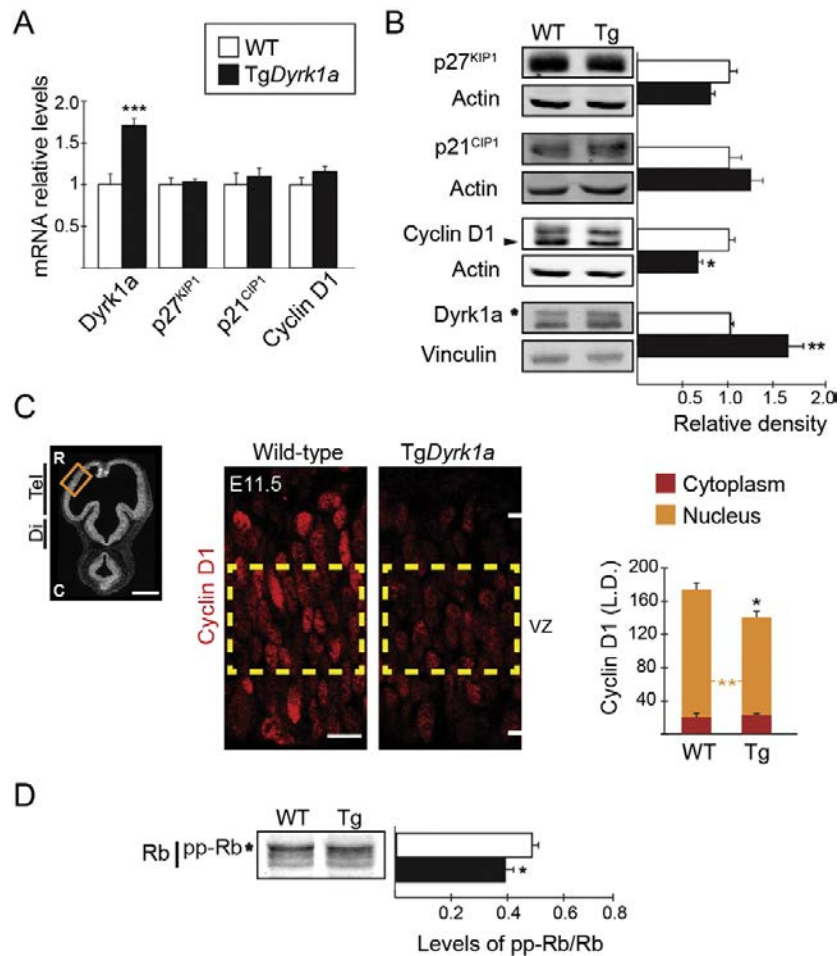


Fig. 1. *TgDyrk1a* RG progenitors show decreased levels of nuclear Cyclin D1 and hyperphosphorylated retinoblastoma. (A) Relative mRNA levels of *Dyrk1a*, *p27^{KIP1}*, *p21^{CIP1}* and *Cyclin D1* determined by RT-PCR on mRNA obtained from the telencephalon of E11.5 wild-type (WT) and *TgDyrk1a* embryos. (B) Representative Western blots of extracts prepared from the telencephalon of E11.5 embryos and probed with the indicated antibodies. Histograms show the protein levels in *TgDyrk1a* embryos normalized to actin or vinculin levels and expressed relative to the WTs. Arrowhead indicates the band corresponding to the Cyclin D1 isoform that contains T286 and asterisk indicates the band corresponding to Dyrk1a. (C) Picture of an E11.5 coronal brain section with nuclei visualized with Hoechst indicating the region in the dorsal telencephalon (Tel) where quantifications were done (image on the left), and WT and *TgDyrk1a* (Tg) sections immunostained for Cyclin D1 (images on the right). The histogram shows the labelling densities (L.D.) of Cyclin D1 fluorescence signals in the nucleus and cytoplasm of radial glial progenitors of the ventricular zone (VZ) region indicated by the yellow square and calculated as shown in Supplementary Fig. 2C and D. C, caudal; Di, Diencephalon; Tel, Telencephalon; R, rostral. (D) Representative Western blot and its quantification showing the levels of retinoblastoma (pRb) that is hyperphosphorylated (pp-Rb) in E11.5 WT and *TgDyrk1a* total telencephalic extracts. Histogram values are the mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ ($n \geq 3$). Bars = 500 μ m (left picture in C) and 20 μ m (right pictures in C).

3.2. *TgDyrk1a* RG Progenitors of the Dorsal Telencephalon Have Longer Cell Cycle Duration

The results presented so far suggested that DYRK1A-dependent phosphorylation of T286 in Cyclin D1 might provide a means of regulating Cyclin D1-Cdk activity in RG progenitors. Indeed, in fibroblast cells the phosphorylation of Cyclin D1 by DYRK1A induces a dose-dependent increase in the duration of the G1 phase (Chen et al., 2013). Given the importance of Cyclin D-Cdk activity in cell cycle progression, we wanted to know whether the deficit of Cyclin D1 in *TgDyrk1a* RG progenitors was affecting G1 phase duration. To test this possibility, we estimated the duration of the total cell cycle and the length of the different cell cycle phases in telencephalic RG progenitors of E11.5 wild-type and *TgDyrk1a* embryos by assessing the accumulation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) *in vivo*, as described previously (Takahashi et al., 1993; Arai et al., 2011) (see schedule in Fig. 2A). The growth fraction (GF) of RG progenitors (nuclei in the VZ that do not

express Tbr2 or Tuj1; Fig. 2B) reached the maximum labelling index value in both genotypes (Fig. 2C), indicating that all progenitors were cycling. However, total cell cycle duration (Tc) and S phase duration (Ts) calculated from the best fitted slope defined by the increasing labelling index values (Fig. 2C) were increased by 4.8 h and by 2.8 h, respectively, in the transgenic progenitors overexpressing DYRK1A (Fig. 2E). Duration of the G2 and M phases, measured by combining EdU labelling with staining for phospho-Histone 3 (pH3) to label cells in mitosis (Fig. 2D), was similar in both genotypes (Fig. 2E). In contrast, the duration of the G1 phase, derived by subtracting the duration of the S/G2/M phases from the Tc value, was 1.9 h longer in *TgDyrk1a* progenitors than in the wild-type. Thus, cell cycle lengthening in RG progenitors overexpressing DYRK1A results from an increased duration of the G1 and S phases. S phase durations in E11.5 wild-type and *TgDyrk1a* RG progenitors assessed by the IdU, BrdU double-labelling method described in Martynoga et al. (2005) (see Supplementary Fig. 4A–C) also showed that transgenic progenitors overexpressing

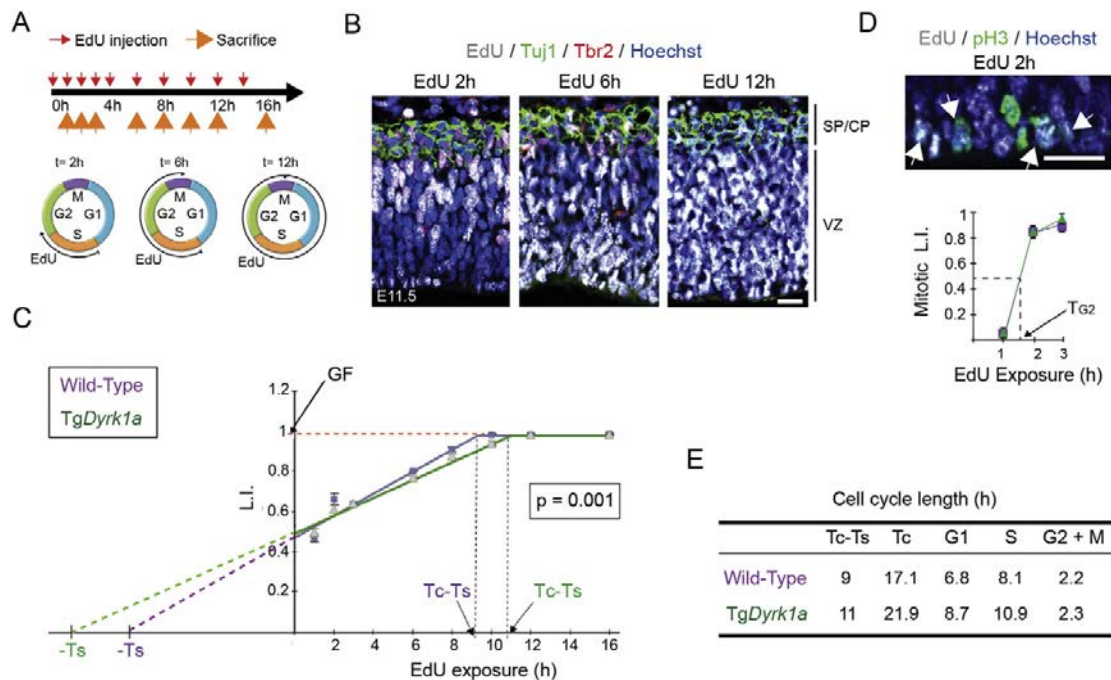


Fig. 2. *TgDyrk1a* RG progenitors have longer cell cycles due to an enlargement of the G1 and S phases. (A) Schedule of the cumulative EdU-labelling protocol employed to calculate the cell cycle parameters in E11.5 radial glial progenitors of the dorsal telencephalon. Red and orange arrows indicate the time points at which EdU was injected and the time points at which embryos were harvested, respectively. (B) Representative confocal images of brain sections from wild-type embryos exposed to EdU for the indicated time and stained for EdU, Tuj1 and Tbr2. Nuclei were visualized with Hoechst. CP, cortical plate; SP, subplate; VZ, ventricular zone. (C) Plot showing the labelling indexes (L.I.; proportion of EdU-labelled nuclei) of radial glial progenitors (Tbr2⁻, Tuj1⁻ cells in the VZ) in wild-type and *TgDyrk1a* embryos at the indicated time of EdU exposure. GF, growth fraction (dashed red line); Tc, cell cycle duration; Ts, S-phase duration; Tc-Ts, time at which the labelling index reaches the GF (dashed black lines). (D) Representative image of a section from a wild-type embryo (2 h EdU exposure) stained for EdU and pH3 and nuclei visualized with Hoechst. The plot shows the mitotic L.I. (proportion of EdU-labelled radial glial progenitors in mitosis (pH3⁺)) at the indicated times of EdU exposure in wild-type and *TgDyrk1a* embryos. TG2, G2-phase duration. Arrows in the image point to the mitotic nuclei (green) that were labelled for EdU (grey). (E) Table summarizing the cycle parameters of wild-type and *TgDyrk1a* radial glial progenitors. Estimation of G1 and M phase durations is described in Materials and Methods. L.I. values (in C) and mitotic L.I. values (in D) are the mean \pm S.E.M. (n \geq 4). The P value indicated in C was obtained using the Linear Regression Model of the Prism software as indicated in Materials and Methods. Bars = 20 μ m.

DYRK1A have longer S phases than wild-type progenitors (Supplementary Fig. 4D). The increase in S phase duration calculated in this experiment (28% increase with respect to the wild-types) was similar to the increase calculated by assessing the accumulation of EdU (35%; Fig. 2E). However, we did find significant differences between the Ts values calculated in the two experiments (Fig. 2E and Supplementary Fig. 4D). This discrepancy should be taken into consideration when comparing cell cycle parameters assessed using different methodologies.

Together, these results indicate that a 1.5-fold increase in DYRK1A protein is sufficient to lower Cyclin D1 levels and alter cell cycle parameters of RG progenitors, lengthening G1 phase, consistent with the ability of DYRK1A to promote phosphorylation of T286 in Cyclin D1.

3.3. DYRK1A Modifies the Proportion of RG-derived Neurons and IPs in a Dosage-dependent Manner

Given the established link between G1 phase duration and the fate of the progenitor daughters (Calegari et al., 2005; Salomoni and Calegari, 2010), we then asked whether a moderate increase in G1 phase duration in RG progenitors is sufficient to affect their neurogenic potential. To this end, we counted the number of cells expressing neural markers in brain sections of E11.5 wild-type and *TgDyrk1a* embryos. The thickness of the dorsal telencephalic VZ at this stage and the number of RG progenitors (Pax6⁺ cells) were very similar in both genotypes (wild-type, 110.7 \pm 3.19 μ m; *TgDyrk1a*, 111.8 \pm 3.72 μ m and Fig. 3A). In contrast, *TgDyrk1a* embryos have fewer cells expressing the neuronal

marker Tbr1 than wild-type embryos (Fig. 3B). This reduction was not due to increased cell death, since the number of apoptotic cells immunolabelled for active caspase3 was similar in both genotypes (cells in a 400 μ m-wide column were 1.95 \pm 0.16 and 1.96 \pm 0.31 in wild-type and in *TgDyrk1a* embryos, respectively; see also Supplementary Fig. 5A). Thus, the deficit of differentiating neurons in the transgenic embryos likely results from impaired neuron production. Indeed, experiments in which the S phase marker BrdU was injected into pregnant females at E11.5 and embryos analysed 24 h later showed a 40% reduction in RG-derived neurons (proportion of BrdU⁺ cells expressing Tbr1) in *TgDyrk1a* embryos with respect to the wild-types (Fig. 3C). This reduction cannot be explained only by the moderate lengthening of the cell cycle observed (28% respect to the wild-types; Fig. 2E), suggesting a possible bias in the division mode of RG progenitors in the transgenic embryos.

During the neurogenic phase of neocortical development, RG self-renewing divisions produce either one neuron or one IP (Noctor et al., 2004; Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004). The transition of a RG progenitor to an IP is associated with the downregulation of Pax6 and the upregulation of Tbr2 (Englund et al., 2005), which is a transcription factor required for IP specification and marks this progenitor type (Sessa et al., 2008). The Pax6-Tbr2 switch also takes place in RG-derived neurons, but the expression of Tbr2 in these cells is shut down as they move from the VZ to the cortical plate and start to express neuronal markers. However, at the onset of IP production, by E11.5, some neurons still have detectable levels of Tbr2 (Englund et al., 2005).

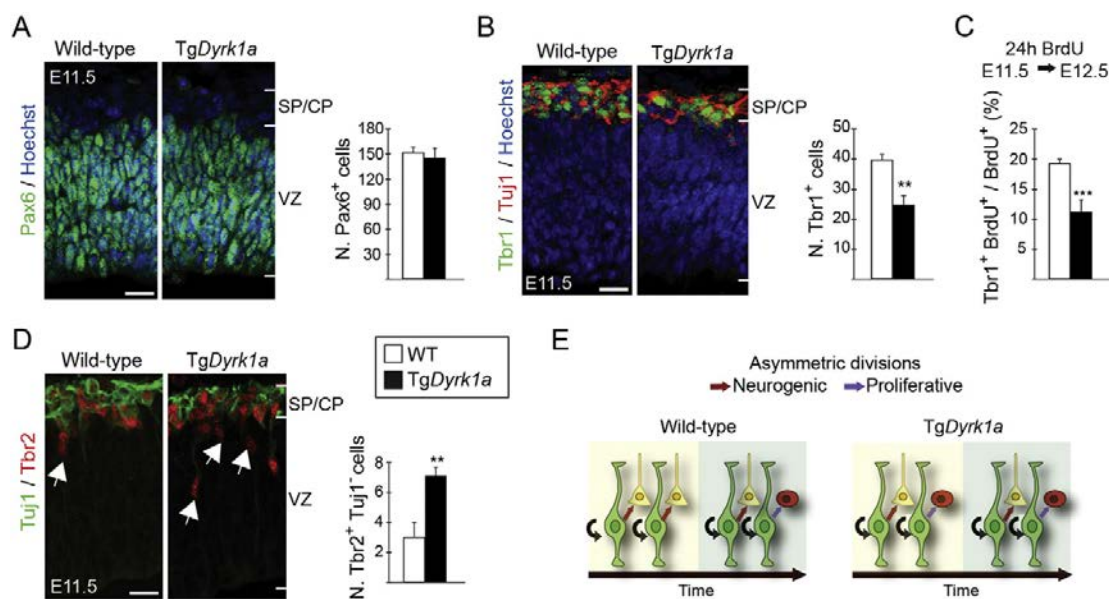


Fig. 3. Impaired early neurogenesis and increased production of IPs in *TgDyrk1a* embryos. (A, B, D) Representative confocal images from coronal brain sections of E11.5 wild-type (WT) and *TgDyrk1a* embryos showing Pax6 expression (green in A), Tbr1 and Tuj1 expression (green and red in B, respectively) and Tuj1 and Tbr2 (green and red in C, respectively). Histograms show the numbers of Pax6⁺ radial glial progenitors (A), Tbr1⁺ neurons (B) and Tbr2⁺ intermediate progenitors; Tbr2⁺, Tuj1⁺ cells (arrows; D) in a 100 μm-wide column of the cortical wall. (C) Histogram showing neuronal production in the dorsal telencephalon of WT and *TgDyrk1a* embryos obtained from BrdU-injected females at E11.5 and harvested 24 h later. Values are the percentage of cells containing BrdU that express the neuronal marker Tbr1 and were obtained by counting BrdU⁺, Tbr1⁺ double immunofluorescent cells in a 100 μm-wide column of the cortical wall. Histogram values are the mean ± S.E.M. **P < 0.01, ***P < 0.001 (n = 3 in A, B, D; n = 4 in C). Bars = 20 μm. CP, cortical plate; SP, subplate; VZ, ventricular zone. (E) Scheme summarizing the cell count results in A to D. Radial glial progenitors (Pax6⁺ cells in green) in the dorsal VZ of both WT and *TgDyrk1a* embryos divide asymmetrically producing another Pax6 progenitor (black arrows) and a neuron (yellow cell) or an intermediate progenitor (red cell). In *TgDyrk1a* embryos the number of divisions producing intermediate progenitors increases at the expenses of the ones producing neurons.

Therefore, to estimate RG-derived IP production at this developmental stage, we counted the Tbr2⁺ cells that did not express the neuronal marker Tuj1 (arrows in Fig. 3D). The cell counts showed that *TgDyrk1a* embryos had more IPs than the wild-types (Fig. 3D). Together, these observations suggest that the deficit of early-born cortical neurons in the transgenic condition may result from an increased proportion of RG proliferative divisions at the expense of the neurogenic divisions (Fig. 3E). As progenitors undergoing proliferative divisions have longer S phases than the ones undergoing neurogenic divisions (Arai et al., 2011), the bias observed in the division mode of *TgDyrk1a* RG progenitors was consistent with the increased duration of the S phase in these progenitors (Fig. 2E and Supplementary Fig. 4).

If DYRK1A-induced degradation of Cyclin D1 is the mechanisms by which this kinase regulates G1 phase duration in RG progenitors and hence the fate of their daughter cells, lowering DYRK1A protein levels in these progenitors should also modify the proportion of neurons and IPs they produce. To test this prediction we did the same quantifications in embryos heterozygous for a *Dyrk1a* null mutation (*Dyrk1a*^{+/-} embryos) (Fotaki et al., 2002). The levels of DYRK1A protein in the telencephalon of E11.5 *Dyrk1a*^{+/-} embryos were reduced (around 50%) with respect to the levels in the *Dyrk1a*^{+/+} control littermates. Importantly, the levels of nuclear Cyclin D1 in *Dyrk1a*^{+/-} dorsal RG progenitors were significantly increased (Supplementary Fig. 5B and C). As in the *TgDyrk1a* gain-of-function model, there were no differences between genotypes in the number of RG progenitors (Pax6⁺ cells in the VZ; Fig. 4A). However, *Dyrk1a*^{+/-} embryos had more Tbr1-expressing neurons than *Dyrk1a*^{+/+} embryos (Fig. 4B). We could not detect any IP cells (Tbr2⁺, Tuj1⁻ cells) in E11.5 *Dyrk1a*^{+/-} embryos (Fig. 4C), indicating that IP production is impaired in this *Dyrk1a* mutant. To confirm this, we counted the number of Tbr2⁺ cells in *Dyrk1a*^{+/+} and *Dyrk1a*^{+/-} embryos two days later (at E13.5), an age where the germinal SVZ is well formed. The number of these cells was reduced in the VZ of

Dyrk1a^{+/-} embryos (Fig. 4D), showing that indeed mutant RG progenitors produce fewer IPs than the controls. Accordingly, *Dyrk1a*^{+/-} mutants had less IPs in the SVZ (Fig. 4D).

The opposing phenotypes of *Dyrk1a* gain- and loss-of-function mutant embryos strongly suggest that moderate variations in the levels of nuclear Cyclin D1 in RG progenitors bias their division mode, favouring asymmetric proliferative divisions when Cyclin D1 levels decrease and asymmetric neurogenic divisions when they increase (see schemes in Figs. 3E and 4E).

3.4. Triplication of *Dyrk1a* Alters Neuron Production and the Onset of Gliogenesis in the Dorsal Telencephalon

The majority of neurons in the neocortex are generated in the SVZ from IPs (indirect neurogenesis) (Kowalczyk et al., 2009; Noctor et al., 2007; and scheme in Fig. 5A) and, therefore, a small variation in the number of these progenitors is expected to have a significant impact on neuron cellularity. Since the production of IPs is augmented in E11.5 *TgDyrk1a* embryos (Fig. 3D), and DYRK1A is expressed in the VZ and SVZ during all the neurogenic phase of cortical development (Supplementary Fig. 6), we counted the IPs generated from RG progenitors (Tbr2⁺ cells in the VZ; Fig. 5B) and the ones in the SVZ (Tbr2⁺ cells in the SVZ; Fig. 5B) in wild-type and *TgDyrk1a* embryos at different developmental stages. During early neurogenesis, until E14.5, the number of Tbr2 progenitors in the VZ and SVZ increased in both wild-type and transgenic embryos (Fig. 5A and B). However, *TgDyrk1a* embryos had more Tbr2 progenitors in both germinal regions at E12.5 and E13.5 (Fig. 5B).

Contrary to RG progenitors that divide in the VZ, IPs divide in the SVZ (Noctor et al., 2004; Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004; and scheme in Fig. 5A). The number of pH3⁺ cells in the telencephalic ventricular surface (apical mitosis) was similar in wild-type and *TgDyrk1a*

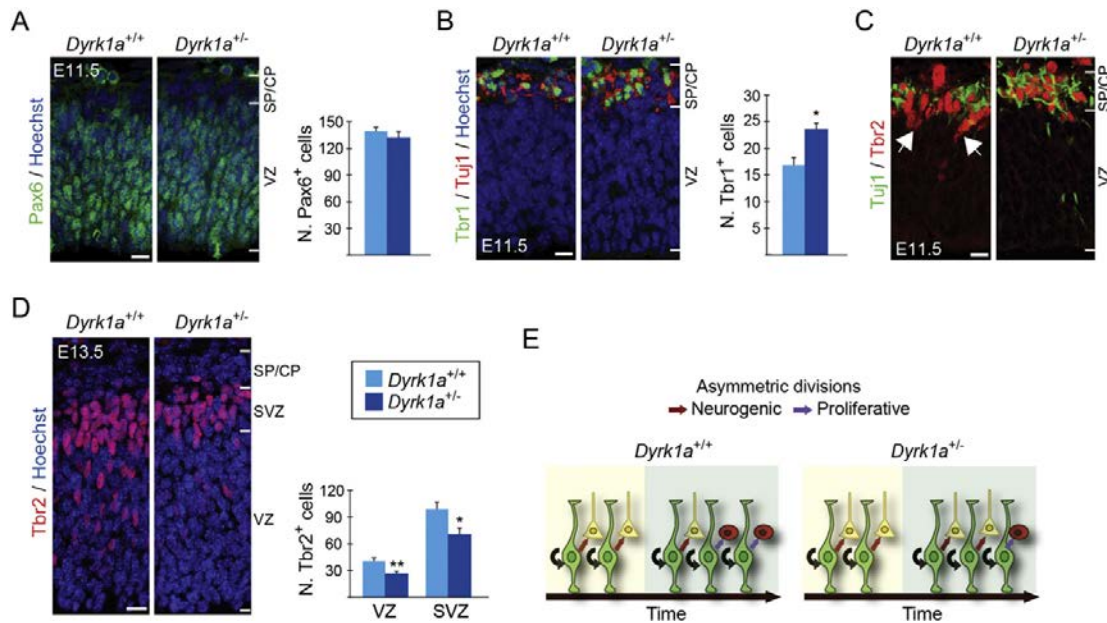


Fig. 4. Increased early neurogenesis and decreased production of IPs in *Dyrk1a*^{+/-} embryos. (A to D) Representative confocal images from coronal brain sections of E11.5 (A to C) and E13.5 (D) *Dyrk1a*^{+/+} and *Dyrk1a*^{+/-} embryos showing Pax6 expression (A), Tbr1 and Tuj1 expression (B), Tbr2 and Tuj1 expression (C) and Tbr2 expression (D). Histograms show the numbers of Pax6⁺ radial glial progenitors (A), Tbr1⁺ neurons (B) and Tbr2⁺ intermediate progenitors (D) in a 100 μm-wide column of the cortical wall. Histogram values are the mean ± S.E.M. *P < 0.05, **P < 0.01 (n ≥ 3 in A to C; n = 4 in D). Bars = 20 μm. CP, cortical plate; SP, subplate; VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone. (E) Scheme summarizing cell count results in A to D. Radial glial progenitors (Pax6⁺ cells in green) in the VZ of both *Dyrk1a*^{+/+} and *Dyrk1a*^{+/-} embryos divide asymmetrically producing another Pax6 progenitor (black arrows) and a neuron (yellow cell) or an intermediate progenitor (red cell). In *Dyrk1a*^{+/-} mutants the number of divisions producing neurons increases at the expenses of the ones producing progenitors.

embryos at E13.5 and E16.5 (Fig. 5C), indicating that during neurogenesis the number of RG divisions was not altered in *Dyrk1a* transgenic embryos. Accordingly, there were no differences between genotypes in the numbers of RG progenitors during neurogenesis (Pax6⁺ cells in a 100 μm-wide column were: wild-type, 127.11 ± 7.56; Tg*Dyrk1a*, 133.83 ± 6.23 at E13.5 and wild-type, 72.61 ± 3.98; Tg*Dyrk1a*, 80.53 ± 5.91 at E16.5). However, the number of pH3⁺ cells in the SVZ (basal mitosis) was significantly increased in E13.5 Tg*Dyrk1a* embryos, which correlated with the increased number of IPs in the SVZ observed at this stage (Fig. 5C).

As neurogenesis proceeds, IPs become the main source of neocortical neurons (Kowalczyk et al., 2009; and Fig. 5A). To evaluate how the increased number of IPs affects neuron production in the transgenic condition, we counted all differentiating neurons in the dorsal telencephalon of wild-type and Tg*Dyrk1a* embryos at E13.5 using the neuronal marker Tbr1. The number of Tbr1⁺ cells in the transgenic embryos was still lower at this developmental stage (Fig. 5D), but the reduction (15%), was less severe than in E11.5 (40%). This suggests that indirect neurogenesis is higher in Tg*Dyrk1a* embryos than in the wild-types, partially compensating for the deficit of RG-derived neurons (Fig. 3B and C). To provide evidence for this, we labelled cells in S-phase with BrdU at E13.5 and estimated the proportion of these cells that exited the cell cycle 24 h later by doing double immunostaining with BrdU and Ki67 antibodies. As shown in Supplementary Fig. 7A, cell cycle exit rates were similar in the telencephalon of wild-type and Tg*Dyrk1a* embryos, indicating that indeed indirect neurogenesis at this stage is reducing the deficit of early-born RG-derived neurons in embryos with 3 copies of *Dyrk1a*. Then we asked whether the advanced production of IPs in these embryos (Figs. 3D and 5B) alters the fate of the neurons they produce. The results of a birthdate experiment performed by injecting BrdU into pregnant females at E13.5, when the production of layer V callosal projection neuron peaks (Molyneux et al., 2007),

indicated that the differentiating program in the dorsal telencephalon of Tg*Dyrk1a* embryos is slightly advanced (Supplementary Fig. 7B and C), paralleling the advanced production of IPs.

In wild-type embryos, during the late phase of cortical neurogenesis, by E16.5, the production of IPs (Tbr2⁺ cells in the VZ; Fig. 5B) decreases and the number of IP terminal divisions in the SVZ increases (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; and scheme in Fig. 5A). IP production in the VZ of Tg*Dyrk1a* embryos was normal at E14.5 and E16.5 (green rectangles in Fig. 5B). The number of IPs in the SVZ of these embryos was also normal at E14.5 but decreased at E16.5 (purple rectangles in Fig. 5B). This decrease did not result from increased apoptosis, since the number of cells in E14.5 embryos that expressed the active form of caspase3 was similar in both genotypes (cells in a 1400 μm-wide column were 7.9 ± 1.26 and 9.5 ± 1.50 in wild-type and Tg*Dyrk1a* embryos, respectively). Since the number of mitoses in the SVZ of E16.5 Tg*Dyrk1a* and wild-type embryos was similar (Fig. 5C), the decreased number of SVZ IPs observed in Tg*Dyrk1a* embryos at this stage (Fig. 5B) could result from increased terminal divisions leading to an advanced exhaustion of the IP pool. If this were the case, the production of neurons in Tg*Dyrk1a* embryos should increase between E14.5 and E16.5. To assess this, we counted cells in the cortical layers defined by the layer-specific markers Tbr1 and Ctip2 at E16.5 (Molyneux et al., 2007). As predicted, the number of neurons in the external layers (defined by the lack of Tbr1 and Ctip2 expression) was augmented in Tg*Dyrk1a* embryos (Fig. 5D). At this stage, Tbr1 is expressed in layer VI early-born neurons (Bulfone et al., 1995) and in newborn upper layer neurons that are migrating to their final position and still expressed this transcription factor. The deficit of Tbr1⁺ neurons observed in E13.5 Tg*Dyrk1a* embryos was no longer evident at E16.5 (Fig. 5D), which is in accordance with more neurons being produced in the transgenic embryos at this stage. The number of layer V neurons (cells expressing Ctip2) was not affected by the overexpression of DYRK1A (Fig. 5D). This, together with the

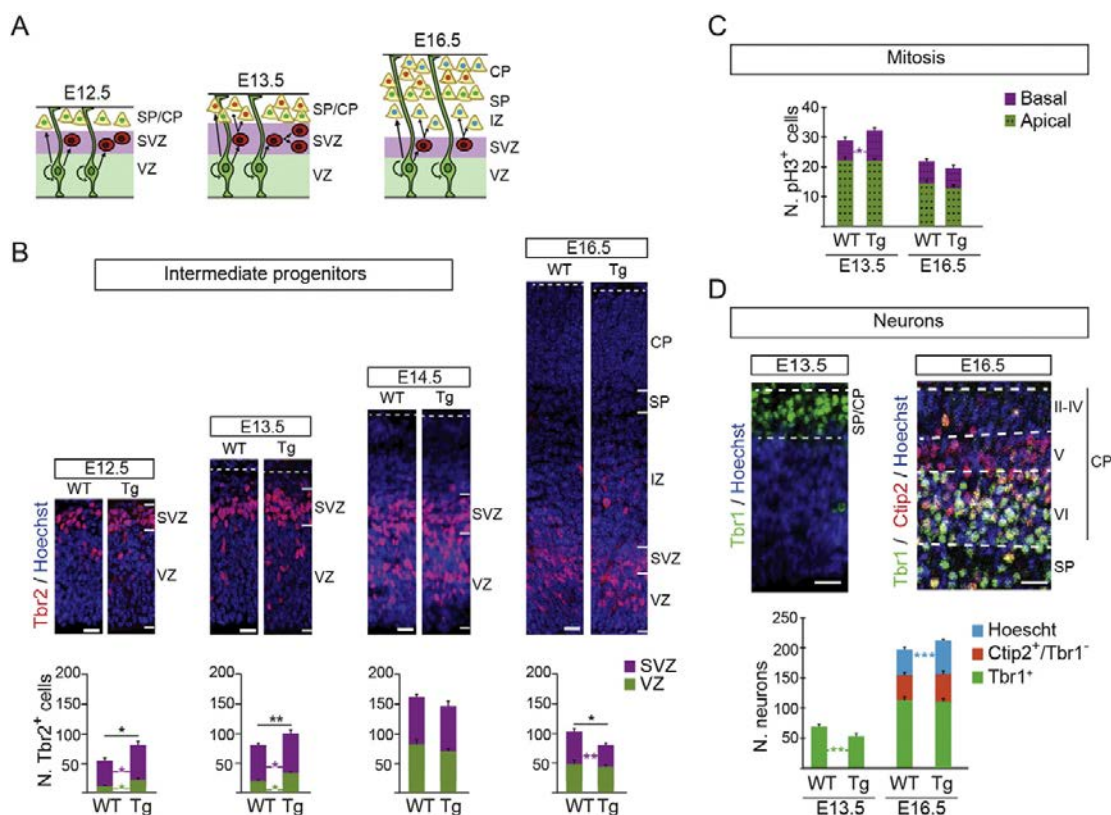


Fig. 5. *TgDyrk1a* embryos show altered numbers of neurons and IPs along corticogenesis. (A) Scheme showing the cellularity of the ventricular (VZ) and subventricular (SVZ) germinal layers along the neurogenic phase of neocortical development and the division mode of the two main progenitor types in these layers; radial glial progenitors (in green) and intermediate progenitors (in red). Note that cortical neurons are generated following an inside–outside pattern and that most of the upper layer neurons (yellow neurons with blue nuclei) are produced around E16.5 by terminal divisions of intermediate progenitors. (B) Representative images of wild-type (WT) and *TgDyrk1a* (Tg) embryonic brain sections from different developmental stages immunostained for Tbr2 and nuclei labelled with Hoechst, and histograms showing the numbers of Tbr2⁺ progenitors (intermediate progenitors) in the VZ (green bars) and in the SVZ (purple bars) in a 100 μm -wide column of the cortical wall. (C) Histogram showing the number of pH3⁺ cells in the VZ (green bar; apical mitosis) and in the SVZ (purple bar; basal mitosis) in a 600 μm -wide column of the cortical wall. (D) Representative images of WT brain embryo sections of the indicated developmental stages immunostained for layer-specific markers, and histogram showing the numbers of total neurons (Tbr1⁺ cells) at E13.5, and the numbers of layer VI neurons (Tbr1⁺ cells), layer V neurons (Ctip2⁺, Tbr1⁻ cells) and layers II–IV neurons (Ctip2⁻, Tbr1⁻ Hoechst labelled cells) at E16.5 in a 100 μm -wide column of the cortical wall. Histogram values are the mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n \geq 3$). Bars = 20 μm . CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; SP, Subplate.

birthdate data shown in Supplementary Fig. 7C, suggests that Ctip2 neurons in the *Dyrk1a* embryos are produced earlier in development but at normal rates. In summary, our results show that a 1.5-fold increase in DYRK1A protein levels disturbs the number of neocortical neurons that are generated through development by direct and indirect neurogenesis.

As neurogenesis progresses and the length of the G1 phase increases, the levels of Cyclin D1 in dorsal VZ cells progressively decrease, and by the end of the neurogenic phase, by E18.5, Cyclin D1 immunolabelling in the ventricular proliferative region was very faint (Supplementary Fig. 8A). Similar to the situation at the onset of neurogenesis (Fig. 1B and C), the levels of nuclear Cyclin D1 inversely correlated to the levels of DYRK1A in E13.5 embryos (Supplementary Figs. 6 and 8B). In contrast and despite DYRK1A being still present in the VZ of E16.5 embryos (Supplementary Fig. 6), the levels of nuclear Cyclin D1 in *TgDyrk1a* VZ progenitors were normal (Supplementary Figs. 6A and 8C). Consistent with published data (Glickstein et al., 2009), we only detected a few cells expressing high Cyclin D1 levels in the SVZ. Therefore, our expression data and the phenotype of *TgDyrk1a* transgenic embryos indicate that the altered production of upper layer neurons observed in these embryos does not result from the regulatory action of DYRK1A on Cyclin D1 degradation.

The generation of macroglial cells in the mouse dorsal telencephalon begins around birth when VZ progenitors lose their capacity to generate neurons and become gliogenic (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Immunolabelling for Cyclin D1 revealed the presence of a population of cells expressing high levels of the protein in the region above the SVZ, the intermediate zone, of E16.5 *TgDyrk1a* embryos that was almost absent in the wild-types (Supplementary Fig. 8C). Most of these cells also expressed Platelet-derived growth factor receptor- α (PDGFR α) (Supplementary Fig. 8D), which is a marker of oligodendrocyte precursors (Rowitch, 2004). In accordance, *TgDyrk1a* embryos at this stage had an increased number of precursors expressing the oligodendrocytic marker Olig2 (Rowitch, 2004) (Fig. 6A). These results indicate that *TgDyrk1a* RG progenitors acquire their capacity of producing glial cells before the wild-types (Fig. 6C).

3.5. Postnatal *TgDyrk1a* Mice Exhibit an Altered Proportion of Neocortical Projection Neurons

To estimate the impact of the neurogenic defects observed in *TgDyrk1a* embryos, we counted the number of neurons expressing layer-specific markers in wild-type and *TgDyrk1a* mice at P0, just after

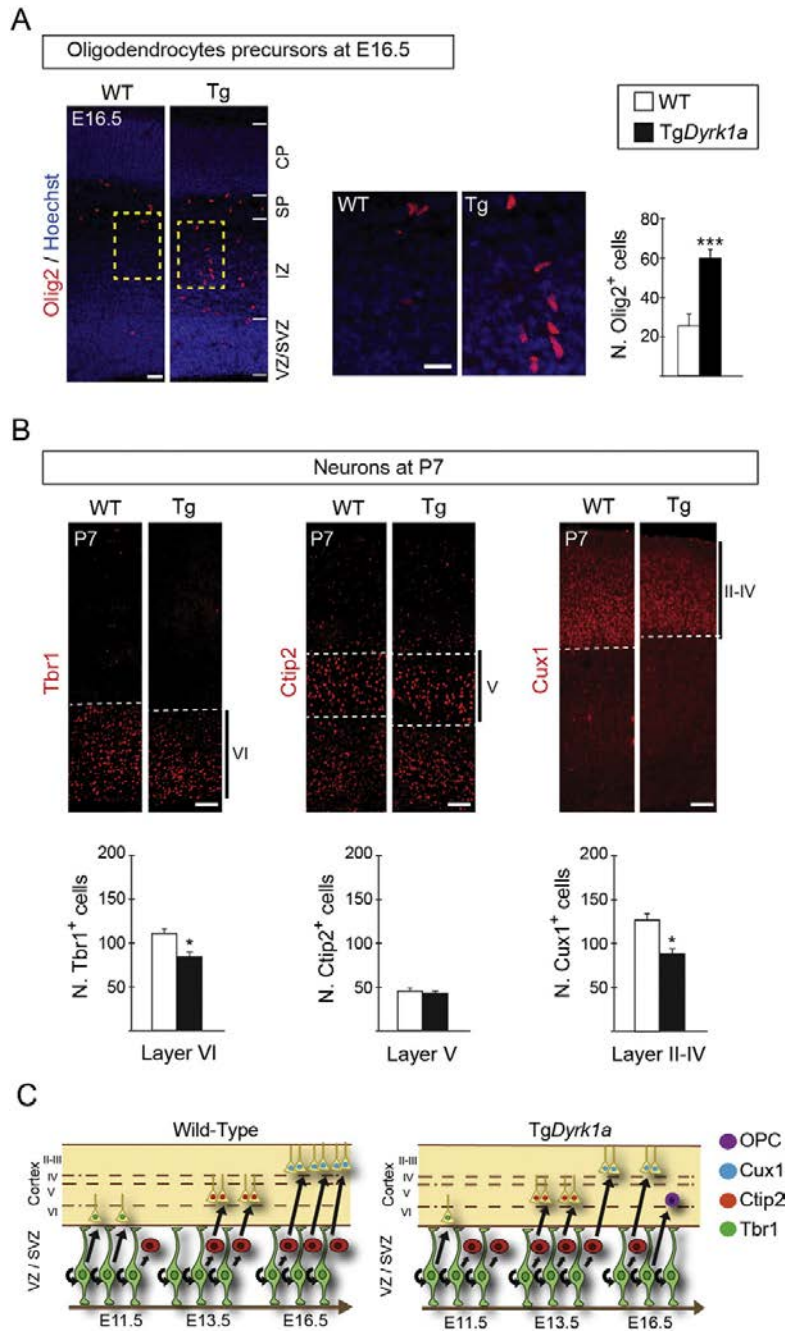


Fig. 6. The *TgDyrk1a* model shows an advanced production of oligodendrocyte progenitors and decreased neuronal cellularity in specific cortical layers. (A) Representative coronal sections from E16.5 wild-type (WT) and *TgDyrk1a* (Tg) brains immunostained for Olig2 and nuclei labelled with Hoechst. Yellow dashed rectangles indicate the region magnified in the images on the right. Histogram shows the number of Olig2⁺ cells in a 300 μm-wide column of the cortical wall. (B) Representative coronal sections from P7 WT and Tg brains immunostained for Tbr1 (left), Ctip2 (middle) or Cux1 (right), and histograms showing the number of layer VI Tbr1⁺ neurons, layer V Ctip2⁺ neurons and layers II–IV Cux1⁺ neurons in a 100 μm-wide column of the cortical wall. Values are the mean ± S.E.M. **P* < 0.05, ****P* < 0.001 (*n* ≥ 3). Bars = 50 μm. CP, cortical plate; SP, subplate; VZ, ventricular zone; SVZ, Subventricular zone. (C) Schemes showing the birth time of Tbr1 neurons, Ctip2 neurons, Cux1 neurons and oligodendrocyte precursor cells (OPC) in the telencephalon of a WT and a Tg embryo and the progenitor type (radial glial (green) or intermediate (red) progenitor) that produces these cells. The deficits of early-born (Tbr1⁺) neurons and late born (Cux1⁺) neurons in transgenic animals result, respectively, from the decreased neuronal production during early neurogenesis and from the premature exhaustion of the intermediate progenitor pool during late neurogenesis. Note that the generation of OPCs is advanced in Tg embryos.

the end of neurogenesis, and at P7, when radial migration has ended and projection neurons are in their final layer position (Miller, 1988). At these developmental stages, Tbr1 expression in the neocortex is almost restricted to layer VI neurons (Bulfone et al., 1995), which are mainly generated between E11.5 and E13.5 (Molyneaux et al., 2007). According to the neuron deficit observed in *TgDyrk1a* embryos during this period (Figs. 3B and 5D), the number of layer VI Tbr1⁺ neurons in transgenic animals was lower than in the wild-types at both P0 and P7 (Fig. 6B and Supplementary Fig. 9A). In contrast, the number of layer V subcerebral neurons that express high levels of Ctip2 (Arlotta et al., 2005) was normal in *TgDyrk1a* postnatal animals (Fig. 6B and Supplementary Fig. 9B), which is in accordance with the normal numbers of layer V Ctip2 neurons observed in E16.5 *Dyrk1a* transgenic embryos (Fig. 5D). Superficial cortical projection neurons are mostly produced by SVZ IPs and express the transcription factors Mef2c (Leifer et al., 1993) and Cux1 (Nieto et al., 2004). The number of layers II–IV Mef2c⁺ neurons at P0 (Supplementary Fig. 9B) and of Cux1⁺ neurons at P7 (Fig. 6B) was significantly lower in *TgDyrk1a* animals than in the wild-types. This correlated with the decrease in IP cell numbers displayed by transgenic embryos from E14.5 to E16.5 (Fig. 5B). Moreover, Tbr1⁺, Ctip2⁺ and Cux1⁺ neurons in P7 *TgDyrk1a* animals had a normal layer distribution (Fig. 6B), indicating that the overexpression of DYRK1A did not affect radial migration of cortical differentiating neurons.

In summary, the results presented so far show that a 1.5-fold increase in DYRK1A protein levels diminishes neuron production rates at the beginning (by E11.5) and the end (by E16.5) of dorsal cortical neurogenesis. The deficits in early-born neurons and late-born neurons in the DYRK1A overexpressing model can be explained, respectively, by the impaired production of RG-derived neurons and the early exhaustion of the IP pool (see scheme in Fig. 6C).

3.6. Normalization of *Dyrk1a* Gene-dosage Restores Cyclin D1 Protein Levels and the Neurogenic Potential of RG Progenitors in Ts65Dn Embryos

Similar to the *TgDyrk1a* model, VZ progenitors of the dorsal telencephalon in trisomic Ts65Dn embryos have longer cell cycle duration than euploid progenitors. Importantly, these embryos show reduced neuron production during the early phase of corticogenesis and a transient increase in the numbers of Tbr2⁺ IPs and SVZ dividing progenitors (cells in mitosis) at later stages. As a consequence, the growth of the cortical wall is delayed in trisomic Ts65Dn embryos (Chakrabarti et al., 2007). The similarities between the Ts65Dn model and the *TgDyrk1a* model reported here, suggest that the triplication of *Dyrk1a* contributes to the early neurogenic cortical defects occurring prenatally in the Ts65Dn model. To investigate this, we first checked Cyclin D1 protein levels in total telencephalic extracts of E11.5 Ts65Dn embryos, which contain 1.5-fold more DYRK1A protein than the extracts from euploid embryos. Importantly, Cyclin D1 levels were decreased in Ts65Dn embryos (Supplementary Fig. 10). Next, we checked whether normalization of *Dyrk1a* gene-dosage in the trisomic embryos could normalize Cyclin D1 levels in dorsal RG progenitors. For this, we estimated the levels of Cyclin D1 in the nucleus and cytosol of RG progenitors in embryo brain sections obtained from crosses between Ts65Dn females and *Dyrk1a*^{+/-} males (Fig. 7A) by using the same analysis we did before in *TgDyrk1a* embryos (Supplementary Fig. 2C and D). By E12.5, one day after the onset of neurogenesis in the dorsal telencephalon, Cyclin D1 protein levels in Ts65Dn RG progenitors were lower than in euploid progenitors (Fig. 7B). Moreover, Cyclin D1 content in the nuclei of Ts65Dn progenitors diminished to similar extents as in *TgDyrk1a* progenitors (Figs. 1C and 7B). These data indicate that nuclear levels of Cyclin D1 in Ts65Dn apical progenitors are controlled by DYRK1A. Accordingly, the genetic normalization of *Dyrk1a* dosage in Ts65Dn progenitors increased the amount of total and nuclear Cyclin D1 to euploid levels (Fig. 7B). As expected by the result presented in Supplementary

Fig. 5B, RG progenitors in *Dyrk1a*^{+/-} littermate embryos had more Cyclin D1 in their nuclei than in euploid embryos (Fig. 7B).

In Ts65Dn embryos, progenitors of the telencephalic VZ have longer cell cycle duration due to a lengthening of the G1 and S phases (Chakrabarti et al., 2007). If G1 phase lengthening biases the type of RG self-renewing divisions, as we propose for *TgDyrk1a* progenitors (Fig. 3E), Ts65Dn RG progenitors should produce fewer neurons and more IPs. To investigate this possibility we counted apical progenitors (Pax6⁺ cells), neurons (Tbr1⁺ cells) and IPs (Tbr2⁺ cells that do not express the neuronal marker Tuj1) in E12.5 brain sections of the four genotypes resulting from the crosses depicted in Fig. 7A. As in the *TgDyrk1a* model, the thickness of the dorsal VZ and the numbers of Pax6⁺ progenitors in radial columns were similar in euploid and Ts65Dn embryos (wild-type, 135.8 ± 3.06 μm; Ts65Dn, 131.3 ± 3.70 μm; Supplementary Fig. 11). Moreover, Ts65Dn progenitors produced fewer neurons (Supplementary Fig. 11A and Fig. 7C) and more IPs than euploid progenitors (Fig. 7C). The phenotype in Ts65Dn embryos reported here is consistent with the reduced production of early-born neurons and the increased number of Tbr2⁺ progenitors in the SVZ observed at later developmental stages in these embryos (Chakrabarti et al., 2007). Importantly, both neuron and IP numbers were normal in Ts65Dn embryos with normal *Dyrk1a* gene-dosage. In accordance with the data shown in Fig. 4B and D, *Dyrk1a*^{+/-} littermate embryos showed increased numbers of neurons and decreased number of Tbr2⁺ progenitors (Fig. 7C). This data indicates that at the onset of cortical neurogenesis triplication of *Dyrk1a* in Ts65Dn RG progenitors increases the production of IPs at the expense of neurons.

The decreased early neurogenesis in Ts65Dn embryos leads to a reduction in the number of layer VI Tbr1⁺ neurons in Ts65Dn postnatal animals (Chakrabarti et al., 2007, 2010). Ts65Dn animals resulting from crosses between trisomic mice and *Dyrk1a*^{+/-} mice (Fig. 7A) had fewer Tbr1 neurons than euploid animals (Fig. 7D). Importantly, the normalization of *Dyrk1a* gene-dosage in the trisomic embryos also restored the number of postnatal layer VI Tbr1 neurons (Fig. 7D). Similar to postnatal *TgDyrk1a* animals, Ts65Dn mice had normal numbers of layer V Ctip2⁺ neurons but decreased numbers of neurons in the external layers. This defect was reverted by decreasing *Dyrk1a* gene-dosage to normal levels (Supplementary Fig. 12), suggesting that the overexpression of DYRK1A also impacts late cortical neurogenesis in the trisomic Ts65Dn model.

In summary, these data show that increased *Dyrk1a* gene-dosage in RG Ts65Dn progenitors diminishes the production of early-born neurons in the developing neocortex and suggest that *Dyrk1a*-mediated degradation of Cyclin D1 is likely the basis of the altered cell cycle parameters observed previously in apical Ts65Dn progenitors.

4. Discussion

In the present study we show that a 1.5-fold increase in DYRK1A protein levels in NSCs of the mouse developing cerebral cortex caused by trisomy of the *Dyrk1a* gene lengthens the cell cycle and decreases the production of RG-derived neurons. Three key observations indicate that the overexpression of DYRK1A in RG progenitors favours RG asymmetric proliferative divisions at the expense of neurogenic divisions: (1) During the early phase of cortical neurogenesis, when the majority of neocortical neurons are generated in the VZ by RG-asymmetric neurogenic divisions (Kowalczyk et al., 2009), the number of IPs (Tbr2⁺ cells) that delaminate from the VZ surface and migrate to the basal surface increases in *TgDyrk1a* embryos whilst the number of neurons (Tbr1⁺ cells) decreases; (2) the number of RG progenitors (Pax6⁺ cells) and the number of mitoses in the apical surface of the ventricle in *TgDyrk1a* embryos are normal during corticogenesis and (3) the number of IPs in the SVZ of *TgDyrk1a* embryos increased during the growing phase of this germinal layer. Moreover, the fact that haploinsufficient *Dyrk1a*^{+/-} embryos produce fewer IPs and more neurons during early corticogenesis indicates that the effect of DYRK1A on the division mode of RG progenitors is dosage-dependent. In both

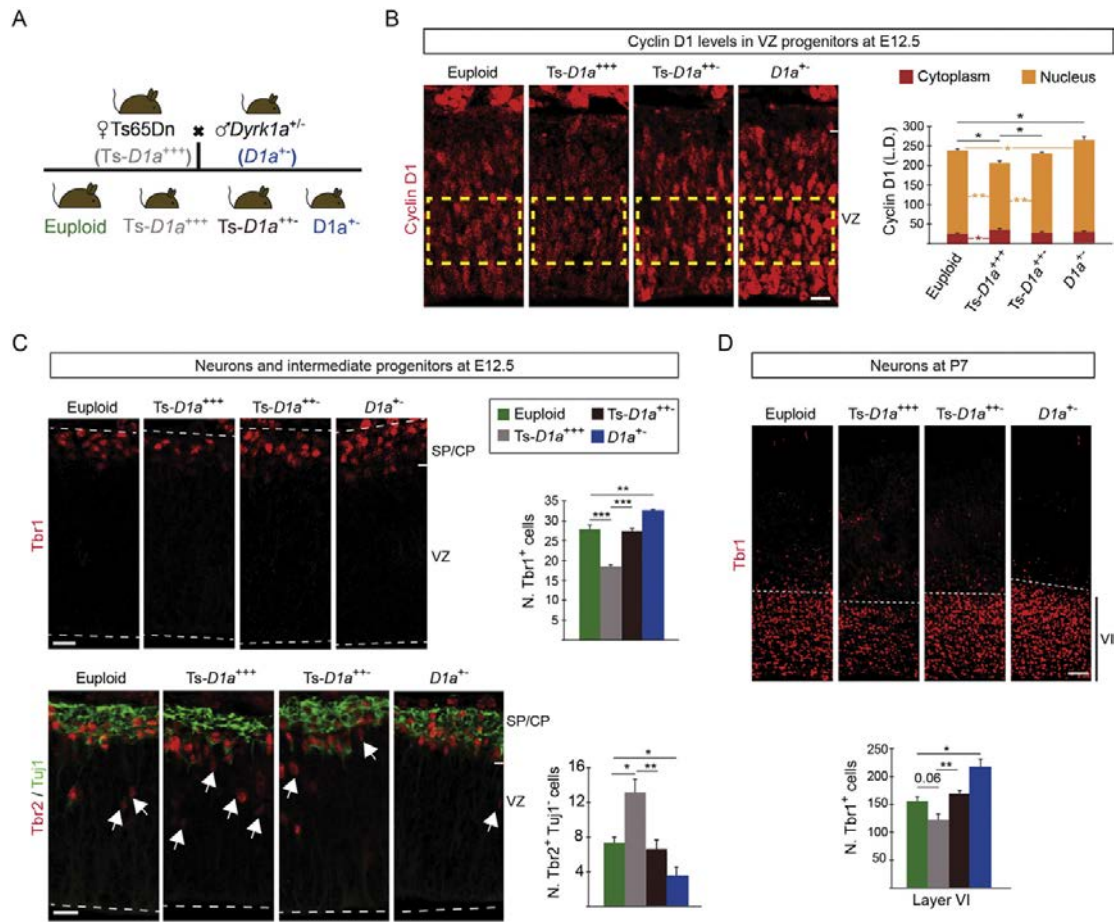


Fig. 7. Trisomy of *Dyrk1a* alters early cortical neurogenesis in the Ts65Dn Down syndrome model. (A) Scheme of the crosses to generate Ts65Dn mice (*Ts-D1a⁺⁺⁺*), Ts65Dn mice with 2 functional copies of *Dyrk1a* (*Ts-D1a⁺⁺*), euploid mice monosomic for *Dyrk1a* (*D1a^{+/-}*) and control (euploid) mice. (B–D) Representative brain coronal sections obtained from E12.5 embryos of the indicated genotypes and immunolabelled for Cyclin D1 (B), Tbr1 (C), or Tbr2 and Tuj1 (C), or from P7 postnatal mice of the indicated genotypes immunolabelled for Tbr1 (D). Histogram in B shows the labelling density (L.D.) of Cyclin D1 fluorescence signal in the nucleus and the cytoplasm of radial glial progenitors of the ventricular zone (VZ) region indicated by the yellow rectangle and calculated as shown in Supplementary Fig. 2C and D. Histograms in C and D show the numbers of Tbr1⁺ neurons (C and D) and Tbr2⁺ intermediate progenitors; Tbr2⁺, Tuj1⁻ cells (C) in a 100 μm-wide column of the cortical wall. Histogram values are the mean ± S.E.M. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (n ≥ 3). Bars = 20 μm in B and C, and 50 μm in D. CP, cortical plate; SP, subplate.

Tg*Dyrk1a* and *Dyrk1a^{+/-}* mouse models, this defect leads to an altered number of projection neurons in the most internal layer of the neocortex.

The *in vivo* cell cycle parameters measured in RG progenitors showed that DYRK1A overexpression specifically affects the duration of the G1 and S cell cycle phases. Cyclin D1 has been shown to be rate limiting for the G1-to-S phase transition (Resnitzky et al., 1994). In the three mouse models used in this work with an imbalanced dosage of *Dyrk1a*, the levels of Cyclin D1 and DYRK1A proteins during the early phase of cortical neurogenesis were inversely correlated, indicating that DYRK1A might induce proteolytic degradation of Cyclin D1 in RG progenitors *in vivo*, as it does in some cultured mammalian cells (Chen et al., 2013; Yabut et al., 2010), which is consistent with the ability of DYRK1A to phosphorylate T286 in Cyclin D1. Whilst DYRK1A has been shown to increase both p21^{CIP1} (Park et al., 2010) and p27^{KIP1} levels (Soppa et al., 2014) in cell culture models we observed no change in the levels of these proteins in Tg*Dyrk1a* embryos. Thus changes in Cyclin D1, and not p21^{CIP1} or p27^{KIP1}, are most likely to be mediating the effects of DYRK1A.

DYRK1B, the closest member to DYRK1A in the DYRK family of protein kinases (Aranda et al., 2011), also phosphorylates Cyclin D1 at T286 (Ashford et al., 2014) and its overexpression induces cell cycle arrest (Ashford et al., 2014). Data obtained in transcriptome analysis of different cell types of the mouse embryo by deep sequencing shows that the expression of *Dyrk1b* in dorsal telencephalic RG progenitors is very low compared to the expression of *Dyrk1a* in these cells (Aprea et al., 2013; GEO GSE51606), indicating that DYRK1A is likely to be the only DYRK kinase involved in the regulation of Cyclin D1 turnover in cortical RG progenitors.

During late corticogenesis, by E16.5, Cyclin D1 protein levels in Tg*Dyrk1a* RG progenitors were normal despite the fact that the levels of DYRK1A in the dorsal telencephalon were still augmented around 50%. Our Cyclin D1 expression data indicates that the levels of Cyclin D1 in wild-type cortical RG progenitors progressively decrease during neurogenesis, paralleling the increased duration of G1 phase (Takahashi et al., 1995). Thus, it is possible that nuclear Cyclin D1 during late neurogenesis is not regulating progression through G1 and, therefore, their levels are not subject to cell cycle regulation.

We show here that IPs express DYRK1A and that at late corticogenesis the pool size of this type of progenitor is significantly diminished in *TgDyrk1a* embryos. Consistent with our Cyclin D1 expression data, it has been shown that cortical IPs do not express Cyclin D1 but instead express Cyclin D2 (Glickstein et al., 2009). Thus, the early exhaustion of IPs in *TgDyrk1a* embryos and the consequent deficit of late-born neurons observed in this transgenic model at postnatal stages, could be caused by the dysregulation of a DYRK1A-mediated function other than Cyclin D1 degradation or could be secondary to the advanced production of these progenitors. Given that the neurogenic to gliogenic switch in *TgDyrk1a* RG progenitors is also advanced, the most plausible explanation for the late neurogenic defects observed in *TgDyrk1a* embryos is that all the neurogenic program in these embryos is slightly altered due to the lengthening of the G1 cell cycle phase that occurs at the beginning of the neurogenic phase of cortical development, which in the short-term leads to more IPs and less neurons.

Our results show a correlation between the output of RG asymmetric divisions and the duration of the G1 cell cycle phase in RG progenitors. This is in line with the accepted idea that the time that a RG progenitor spends in G1 determines the fate of their daughters (Dehay and Kennedy, 2007; Gotz and Huttner, 2005; Salomoni and Calegari, 2010); this is supported by experiments showing a significant effect on cortical neurogenesis by shortening the duration of the G1 phase via forced expression of Cyclin D1 or Cyclin D1/Cdk4 (Lange et al., 2009; Pilaz et al., 2009). The output of shortening G1 phase duration in the short-term (24 h–48 h) is a decrease in neuron production and a concomitant increase in IPs in the VZ and the SVZ, which is the same effect that we have observed at the beginning of neurogenesis in *TgDyrk1a* embryos. Manipulation of the G1 phase in the experiments reported in Lange et al. (2009) and Pilaz et al. (2009) took place during mid-corticogenesis (by E13–E14), which implies that the progenitors are intrinsically different and are exposed to different environmental cues than progenitors at earlier stages. This could explain why an increase in G1 phase duration at the beginning of neurogenesis and a decrease at later stages have similar outputs in the short-term.

In addition to a longer G1 phase, *TgDyrk1a* apical progenitors had a longer S phase. It has been reported that the length of the S phase in cortical progenitors is significantly shorter in progenitors committed to produce neurons than in those undergoing self-expanding divisions (Arai et al., 2011). Therefore, the lengthening of S phase in *TgDyrk1a* RG progenitors could be secondary to the increased number of RG asymmetric proliferative divisions producing IPs due to the action of DYRK1A on G1. The fact that expanding progenitors spend more time in S phase than those producing neurons has been interpreted as a need of these progenitors to guarantee high fidelity DNA replication and repair (Arai et al., 2011). In the early stages of neural system development, the repair of DNA double-strand breaks in proliferating cells occurs via homologous recombination (Orii et al., 2006). In addition to its Cdk-associated activity, nuclear Cyclin D1 promotes homologous recombination by recruiting RAD51 and BRCA2 to the DNA double-strand breaks (Jirawatnotai et al., 2011). Thus, it is possible that *TgDyrk1a* progenitors with limited amounts of Cyclin D1 spend more time in S phase to complete DNA replication.

DYRK1A regulates the activity of several signalling pathways (Aranda et al., 2011) including the calcium/calcineurin/NFATc pathway. In DS this pathway could be inhibited due to a functional interaction of DYRK1A with RCAN1 (another chromosome 21 gene also known as DSCR1) on the activity of NFATc transcription factors (Arron et al., 2006). Recently, it has been reported that moderate overexpression of DYRK1A and RCAN1 in VZ cells achieved by *in utero* electroporation delays neurogenesis in the mouse dorsal telencephalon and that this effect requires the action of these two proteins on NFATc activity (Kurabayashi and Sanada, 2013). The phenotype observed here in *TgDyrk1a* embryos indicates that a 1.5-fold increase in DYRK1A protein levels in cortical progenitors reduces significantly the production of early-born neurons. We have measured the relative levels of *Rcan1*

transcripts and protein isoforms, *Rcan1-1* and *Rcan1-4* (Davies et al., 2007), in the telencephalon of *TgDyrk1a* and wild-type littermate embryos at the onset of neurogenesis. In accordance with the *Rcan1* genetic complement in these embryos we did not find differences between genotypes (Supplementary Fig. 13). As the expression of the *Rcan1-4* transcript is induced by calcineurin-NFATc signalling (Yang et al., 2000), our *Rcan1* expression data indicate that NFATc activity is not significantly perturbed in *TgDyrk1a* progenitors. *Rcan1* is in the chromosomal region that is triplicated in the Ts65Dn model (Haydar and Reeves, 2012). Thus, the fact that genetic normalization of *Dyrk1a* dosage in trisomic Ts65Dn embryos is sufficient to normalize the production of early-born cortical neurons in these embryos shows that *Dyrk1a* is the only gene in the triplicated region responsible for the phenotype.

Our results showing that nuclear levels of Cyclin D1 are reduced in the dorsal telencephalon of Ts65Dn embryos and that genetic normalization of *Dyrk1a* dosage restores Cyclin D1 to normal levels in the trisomic embryos suggests that the action of DYRK1A on Cyclin D1 turnover contributes to the altered cell cycle parameters observed previously in the VZ of these embryos (Chakrabarti et al., 2007). These results together with the decreased number of neurons and the concomitant increase in IPs observed here at the onset of cortical neurogenesis in Ts65Dn embryos indicate that DYRK1A-mediated dysregulation of Cyclin D1 levels in RG progenitors is the cause of the deficit of early-born cortical neurons and contributes to the expansion of the SVZ observed previously in the Ts65Dn model (Chakrabarti et al., 2007). Based on this, and the observation that postnatal *TgDyrk1a* and Ts65Dn mice have a similar deficit of neurons in their neocortices and that the deficit in both external and internal cortical neurons in the trisomic Ts65Dn mouse is restored by normalizing *Dyrk1a* gene-dosage, we hypothesize that DYRK1A is contributing to the delayed growth of the cortical wall previously observed in the Ts65Dn model (Chakrabarti et al., 2007). Future experiments should aim to confirm this hypothesis.

Cell cycle defects (Contestabile et al., 2007) and a deficit of neurons (Larsen et al., 2008; Schmidt-Sidor et al., 1990) have been observed in the cerebral cortex of DS fetuses. Given that fibroblast cells from DS individuals have less Cyclin D1 and enlarged G1 phases due to the overexpression of DYRK1A (Chen et al., 2013), and that the role of DYRK1A on brain development and growth is conserved across evolution (Tejedor and Hammerle, 2011), it is likely that the overexpression of DYRK1A in DS also increases G1 phase duration in RG progenitors of the developing neocortex thereby changing their neurogenic potential and final neuronal output.

DYRK1A has been proposed as a therapeutic target to ameliorate the cognitive deficit associated with DS (Becker and Sippl, 2011); indeed, treatment with epigallocatechin-gallate, which can inhibit DYRK1A, has been used successfully in DS mouse models and in a pilot study with young DS individuals to improve long-term memory (De la Torre et al., 2014). Our results show that the effect of DYRK1A on Cyclin D1 turnover in RG progenitors is dosage-dependent and that the deleterious effect of low levels of nuclear Cyclin D1 on DS cortical neurogenesis begins at early stages of prenatal development. These results should inform the design of prenatal therapeutic interventions aimed at counterbalancing the deleterious effect of DYRK1A triplication on cortical circuitry formation in DS. Finally, since mutations in the human DYRK1A gene in heterozygosity cause primary microcephaly (Courcet et al., 2012) and autism (O'Roak et al., 2012), the phenotype observed here in the *Dyrk1a*^{+/-} mouse model also provides insights into the aetiology of the neurological alterations associated with haploinsufficient mutations in the DYRK1A gene.

Conflict of Interest

The authors declare no competing financial interests.

Authors' Contributions

MLA conceived the project. MJB, SN, PAL and SJC designed the experiments and analysed the data. SN, JA, PAL, ALA, and DO performed the experiments. JMD generated the mBACtgDyrk1a mouse model. SN, MJB and SJC interpreted the data. SN prepared the figures and MLA wrote the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) [Grant numbers SAF-2010-17004, SAF2013-46676-P and CSIC-2010201003], the Jérôme Lejeune Foundation, and the Generalitat de Catalunya [Grant number 2009SGR1464]. S.N. was supported by a FI fellowship from the Generalitat de Catalunya [Fellowship number 2011B1-OG242] and by a FPU fellowship from the MINECO [Fellowship number AP2012-3064]. M.J.B. is supported by the program JAE DOC-CSIC/European Social Fund and JA by a FPI fellowship from the MINECO [Fellowship number BES2011-047472]. S.J.C and D.O. were supported by a strategic grant from the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC). A.L.A. was supported by a BBSRC CASE PhD studentship with AstraZeneca and P.A.L. by a grant from the Association for International Cancer Research. The authors wish to express their gratitude to Elena Rebollo for her advice in the acquisition of confocal images, to Carmen Martínez-Cué and Susana García for providing mouse brain tissues, to Marie-Claude Potier for providing Ts65Dn mice, to Walter Becker for providing DYRK1A plasmids, to Silvia Miralles and M^a Carmen Badosa for technical assistance, to Eva Prats and the personnel of the PRBB and PRAAL-PCB animal facilities for taking care of the mice, and to Mark Sefton for English editorial work.

Appendix A. Supplementary Data

Supplementary Materials and Methods include a description of the DNA plasmids and the protocols for the *In vitro* DYRK Kinase assay, the Analysis of Cyclin D1 phosphorylation by mass spectrometry and the IDU-BrdU double labelling method used to estimate Ts values *in vivo*. Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.01.010>.

References

- Aprea, J., Prenninger, S., Dori, M., Ghosh, T., Monasor, L.S., Wessendorf, E., Zocher, S., Massalini, S., Alexopoulou, D., Lesche, M., et al., 2013. Transcriptome sequencing during mouse brain development identifies long non-coding RNAs functionally involved in neurogenic commitment. *EMBO J.* 32, 3145–3160.
- Arai, Y., Pulvers, J.N., Haffner, C., Schilling, B., Nusslein, I., Calegari, F., Huttner, W.B., 2011. Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat. Commun.* 2, 154.
- Aranda, S., Laguna, A., de la Luna, S., 2011. DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J.* 25, 449–462.
- Arlotta, P., Molyneux, B.J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., Macklis, J.D., 2005. Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development *in vivo*. *Neuron* 45, 207–221.
- Arron, J.R., Winslow, M.M., Polleri, A., Chang, C.P., Wu, H., Gao, X., Neilson, J.R., Chen, L., Heit, J.J., Kim, S.K., et al., 2006. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* 441, 595–600.
- Ashford, A.L., Oxley, D., Kettle, J., Hudson, K., Guichard, S., Cook, S.J., Lochhead, P.A., 2014. A novel DYRK1B inhibitor AZ191 demonstrates that DYRK1B acts independently of GSK3beta to phosphorylate cyclin D1 at Thr(286), not Thr(288). *Biochem. J.* 457, 43–56.
- Becker, W., Sippl, W., 2011. Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A. *FEBS J.* 278, 246–256.
- Breunig, J.J., Haydar, T.F., Rakic, P., 2011. Neural stem cells: historical perspective and future prospects. *Neuron* 70, 614–625.
- Bulfone, A., Smiga, S.M., Shimamura, K., Peterson, A., Puelles, L., Rubenstein, J.L., 1995. T-brain-1: a homolog of Brachyury whose expression defines molecularly distinct domains within the cerebral cortex. *Neuron* 15, 63–78.
- Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C., Huttner, W.B., 2005. Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J. Neurosci.* 25, 6533–6538.
- Chakrabarti, L., Galdzicki, Z., Haydar, T.F., 2007. Defects in embryonic neurogenesis and initial synapse formation in the forebrain of the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J. Neurosci.* 27, 11483–11495.
- Chakrabarti, L., Best, T.K., Cramer, N.P., Carney, R.S., Isaac, J.T., Galdzicki, Z., Haydar, T.F., 2010. Olig1 and Olig2 triplication causes developmental brain defects in Down syndrome. *Nat. Neurosci.* 13, 927–934.
- Chen, J.Y., Lin, J.R., Tsai, F.C., Meyer, T., 2013. Dosage of Dyrk1a shifts cells within a p21-cyclin D1 signaling map to control the decision to enter the cell cycle. *Mol. Cell* 52, 87–100.
- Contestabile, A., Fila, T., Ceccarelli, C., Bonasoni, P., Bonapace, L., Santini, D., Bartesaghi, R., Ciani, E., 2007. Cell cycle alteration and decreased cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus and in the neocortical germinal matrix of fetuses with Down syndrome and in Ts65Dn mice. *Hippocampus* 17, 665–678.
- Courcet, J.B., Faivre, L., Malzac, P., Masurel-Paulet, A., Lopez, E., Callier, P., Lambert, L., Lemesle, M., Thevenon, J., Gigot, N., et al., 2012. The DYRK1A gene is a cause of syndromic intellectual disability with severe microcephaly and epilepsy. *J. Med. Genet.* 49, 731–736.
- Cunningham, J.J., Roussel, M.F., 2001. Cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of the central nervous system. *Cell Growth Differ.* 12, 387–396.
- Davies, K.J., Ermak, G., Rothermel, B.A., Pritchard, M., Heitman, J., Ahnn, J., Henrique-Silva, F., Crawford, D., Canaider, S., Strippoli, P., et al., 2007. Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: regulators of calcineurin. *FASEB J.* 21, 3023–3028.
- Davison, M.T., Schmidt, C., Reeves, R.H., Irving, N.G., Akeson, E.C., Harris, B.S., Bronson, R.T., 1993. Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome. *Prog. Clin. Biol. Res.* 384, 117–133.
- De la Torre, R., De Sola, S., Pons, M., Duchon, A., de Lagran, M.M., Farre, M., Fito, M., Benejam, B., Langohr, K., Rodriguez, J., et al., 2014. Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 278–288.
- DeFelipe, J., Lopez-Cruz, P.L., Benavides-Picciono, R., Bielza, C., Larranaga, P., Anderson, S., Burkhalter, A., Cauli, B., Fairen, A., Feldmeyer, D., et al., 2013. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 202–216.
- Dehay, C., Kennedy, H., 2007. Cell-cycle control and cortical development. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 438–450.
- Delabar, J.M., Theophile, D., Rahmani, Z., Chettouh, Z., Blouin, J.L., Prieur, M., Noel, B., Sinet, P.M., 1993. Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur. J. Hum. Genet.* 1, 114–124.
- Diehl, J.A., Zindy, F., Sherr, C.J., 1997. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 11, 957–972.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., Sherr, C.J., 1998. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 12, 3499–3511.
- Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R.A., Bulfone, A., Kowalczyk, T., Hevner, R.F., 2005. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J. Neurosci.* 25, 247–251.
- Fotaki, V., Dierssen, M., Alcantara, S., Martinez, S., Marti, E., Casas, C., Visa, J., Soriano, E., Estivill, X., Arbones, M.L., 2002. Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6636–6647.
- Glickstein, S.B., Monaghan, J.A., Koeller, H.B., Jones, T.K., Ross, M.E., 2009. Cyclin D2 is critical for intermediate progenitor cell proliferation in the embryonic cortex. *J. Neurosci.* 29, 9614–9624.
- Golden, J.A., Hyman, B.T., 1994. Development of the superior temporal neocortex is anomalous in trisomy 21. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 513–520.
- Gotz, M., Huttner, W.B., 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 777–788.
- Greig, L.C., Woodworth, M.B., Galazo, M.J., Padmanabhan, H., Macklis, J.D., 2013. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 755–769.
- Guedj, F., Pereira, P.L., Najas, S., Barallobre, M.J., Chabert, C., Souchet, B., Sebric, C., Verney, C., Herauld, Y., Arbones, M., et al., 2012. DYRK1A: a master regulatory protein controlling brain growth. *Neurobiol. Dis.* 46, 190–203.
- Hammerle, B., Ulin, E., Guimera, J., Becker, W., Guillemot, F., Tejedor, F.J., 2011. Transient expression of Mnb/Dyrk1a couples cell cycle exit and differentiation of neuronal precursors by inducing p27KIP1 expression and suppressing NOTCH signaling. *Development* 138, 2543–2554.
- Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., Huttner, W.B., 2004. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3196–3201.
- Haydar, T.F., Reeves, R.H., 2012. Trisomy 21 and early brain development. *Trends Neurosci.* 35, 81–91.
- Hibaoui, Y., Grad, I., Letourneau, A., Sailani, M.R., Dahoun, S., Santoni, F.A., Gimelli, S., Guipponi, M., Pelte, M.F., Bena, F., et al., 2014. Modelling and rescuing neurodevelopmental defect of Down syndrome using induced pluripotent stem cells from monozygotic twins discordant for trisomy 21. *EMBO Mol. Med.* 6, 259–277.
- Huttner, W.B., Kosodo, Y., 2005. Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 648–657.
- Ishihara, K., Amano, K., Takaki, E., Shimohata, A., Sago, H., Epstein, C.J., Yamakawa, K., 2010. Enlarged brain ventricles and impaired neurogenesis in the Ts1Cje and Ts2Cje mouse models of Down syndrome. *Cereb. Cortex* 20, 1131–1143.
- Jirawatnotai, S., Hu, Y., Michowski, W., Elias, J.E., Becks, L., Bienvenu, F., Zagazdzon, A., Goswami, T., Wang, Y.E., Clark, A.B., et al., 2011. A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers. *Nature* 474, 230–234.

- Kowalczyk T, Pontious A, Englund C, Daza RA, Bedogni F, Hodge R, Attardo A, Bell C, Huttner W.B., Hevner R.F., 2009. Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 19, 2439–2450.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A., 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 149–184.
- Kurabayashi N, Sanada K., 2013. Increased dosage of DYRK1A and DSCR1 delays neuronal differentiation in neocortical progenitor cells. *Genes Dev.* 27, 2708–2721.
- Lange C, Huttner W.B., Calegari F., 2009. Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. *Cell Stem Cell* 5, 320–331.
- Larsen K.B., Laursen H., Graem N., Samuelsen G.B., Bogdanovic N., Pakkenberg B., 2008. Reduced cell number in the neocortical part of the human fetal brain in Down syndrome. *Ann. Anat.* 190, 421–427.
- Leifer D, Krainc D, Yu Y.T., McDermott J, Breitbart R.E., Heng J, Neve R.L., Kosofsky B, Nadal-Ginard B, Lipton S.A., 1993. MEF2C, a MADS/MEF2-family transcription factor expressed in a laminar distribution in cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1546–1550.
- Lewis D.A., Sweet R.A., 2009. Schizophrenia from a neural circuitry perspective: advancing toward rational pharmacological therapies. *J. Clin. Invest.* 119, 706–716.
- Liu C, Belichenko P.V., Zhang L, Fu D, Kleschevnikov A.M., Baldini A, Antonarakis S.E., Mobley W.C., Yu Y.E., 2011. Mouse models for Down syndrome-associated developmental cognitive disabilities. *Dev. Neurosci.* 33, 404–413.
- Martynoga B, Morrison H, Price D.J., Mason J.O., 2005. Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis. *Dev. Biol.* 283, 113–127.
- Miller M.W., 1988. Development of projection and local circuit neurons in neocortex. In: Peters A, J.E. (Ed.), *Development and Maturation of Cerebral Cortex*. Plenum Press, New York, pp. 133–175.
- Miyata T, Kawaguchi A, Saito K, Kawano M, Muto T, Ogawa M., 2004. Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131, 3133–3145.
- Molyneaux B.J., Arlotta P., Menezes J.R., Macklis J.D., 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 427–437.
- Nieto M, Monuki E.S., Tang H, Imitola J, Haubst N, Khoury S.J., Cunningham J, Gotz M, Walsh C.A., 2004. Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II–IV of the cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 479, 168–180.
- Noctor S.C., Flint A.C., Weissman T.A., Dammerman R.S., Kriegstein A.R., 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409, 714–720.
- Noctor S.C., Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein A.R., 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* 7, 136–144.
- Noctor S.C., Martinez-Cerdeno V, Kriegstein A.R., 2007. Contribution of intermediate progenitor cells to cortical histogenesis. *Arch. Neurol.* 64, 639–642.
- Nowakowski R.S., Lewin S.B., Miller M.W., 1989. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J. Neurocytol.* 18, 311–318.
- Orii K.E., Lee Y, Kondo N, McKinnon P.J., 2006. Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10017–10022.
- O’Roak B.J., Vives L, Fu W, Egerton J.D., Stanaway I.B., Phelps I.G., Carvill G, Kumar A, Lee C, Ankenman K, et al., 2012. Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science* 338, 1619–1622.
- Park J, Oh Y, Yoo L, Jung M.S., Song W.J., Lee S.H., Seo H, Chung K.C., 2010. Dyrk1A phosphorylates p53 and inhibits proliferation of embryonic neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 285, 31895–31906.
- Pilaz L.J., Patti D, Marcy G, Ollier E, Pfister S, Douglas R.J., Betizeau M, Gautier E, Cortay V, Doerflinger N, et al., 2009. Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 21924–21929.
- Reeves R.H., Irving N.G., Moran T.H., Wahn A, Kitt C, Sisodia S.S., Schmidt C, Bronson R.T., Davisson M.T., 1995. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat. Genet.* 11, 177–184.
- Reinholdt L.G., Ding Y, Gilbert G.J., Czechanski A, Solzak J.P., Roper R.J., Johnson M.T., Donahue L.R., Lutz C, Davisson M.T., 2011. Molecular characterization of the translocation breakpoints in the Down syndrome mouse model Ts65Dn. *Mamm. Genome* 22, 685–691.
- Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed S.J., 1994. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1669–1679.
- Ross M.H., Galaburda A.M., Kemper T.L., 1984. Down’s syndrome: is there a decreased population of neurons? *Neurology* 34, 909–916.
- Rowitch D.H., 2004. Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 409–419.
- Rubenstein J.L., 2010. Three hypotheses for developmental defects that may underlie some forms of autism spectrum disorder. *Curr. Opin. Neurol.* 23, 118–123.
- Salomoni P, Calegari F., 2010. Cell cycle control of mammalian neural stem cells: putting a speed limit on G1. *Trends Cell Biol.* 20, 233–243.
- Schmidt-Sidor B, Wisniewski K.E., Shepard T.H., Sersen E.A., 1990. Brain growth in Down syndrome subjects 15 to 22 weeks of gestational age and birth to 60 months. *Clin. Neuropathol.* 9, 181–190.
- Sessa A, Mao C.A., Hadjantonakis A.K., Klein W.H., Broccoli V., 2008. Tbr2 directs conversion of radial glia into basal precursors and guides neuronal amplification by indirect neurogenesis in the developing neocortex. *Neuron* 60, 56–69.
- Soppa U, Schumacher J, Florencio Ortiz V, Pasqualon T, Tejedor F.J., Becker W., 2014. The Down syndrome-related protein kinase DYRK1A phosphorylates p27(Kip1) and Cyclin D1 and induces cell cycle exit and neuronal differentiation. *Cell Cycle* 13, 2084–2100.
- Sun T, Hevner R.F., 2014. Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 217–232.
- Takahashi T, Nowakowski R.S., Caviness Jr., V.S., 1993. Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse. *J. Neurosci.* 13, 820–833.
- Takahashi T, Nowakowski R.S., Caviness Jr., V.S., 1995. The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *J. Neurosci.* 15, 6046–6057.
- Tejedor F.J., Hammerle B., 2011. MNB/DYRK1A as a multiple regulator of neuronal development. *FEBS J.* 278, 223–235.
- Tejedor F, Zhu X.R., Kaltenbach E, Ackermann A, Baumann A, Canal I, Heisenberg M, Fischbach K.F., Pongs O., 1995. Minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* 14, 287–301.
- Tiberi L, Vanderhaeghen P, van den Aemele J., 2012. Cortical neurogenesis and morphogens: diversity of cues, sources and functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 269–276.
- Toyoda A, Noguchi H, Taylor T.D., Ito T, Pletcher M.T., Sakaki Y, Reeves R.H., Hattori M., 2002. Comparative genomic sequence analysis of the human chromosome 21 Down syndrome critical region. *Genome Res.* 12, 1323–1332.
- Wisniewski K.E., 1990. Down syndrome children often have brain with maturation delay, retardation of growth, and cortical dysgenesis. *Am. J. Med. Genet. Suppl.* 7, 274–281.
- Wu J, Wu S.H., Bollig A, Thakur A, Liao D.J., 2009. Identification of the cyclin D1b mRNA variant in mouse. *Mol. Biol. Rep.* 36, 953–957.
- Yabut O, Domogauer J, D’Arcangelo G., 2010. Dyrk1A overexpression inhibits proliferation and induces premature neuronal differentiation of neural progenitor cells. *J. Neurosci.* 30, 4004–4014.
- Yang J, Rothermel B, Vega R.B., Frey N, McKinsey T.A., Olson E.N., Bassel-Duby R, Williams R.S., 2000. Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ. Res.* 87, E61–E68.
- Zetterberg A, Larsson O, Wiman K.G., 1995. What is the restriction point? *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 835–842.