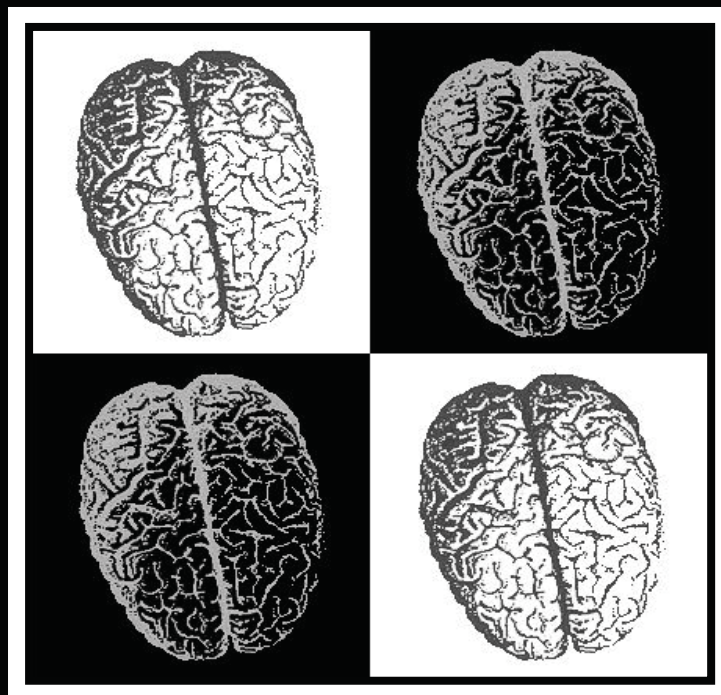

**Efecto de dosis génica de Dyrk1a (Minibrain)
en el proceso neurodegenerativo asociado al
envejecimiento: Un estudio con ratones
genéticamente modificados**



María Martínez de Lagrán Cabredo
Tesis Doctoral



**EFFECTO DE DOSIS GÉNICA DE DYRK1A (MINIBRAIN)
EN EL PROCESO NEURODEGENERATIVO
ASOCIADO AL ENVEJECIMIENTO: UN ESTUDIO CON
RATONES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS**



María Martínez de Lagrán Cabredo
Tesis Doctoral

Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica
Facultad de Medicina
Universidad de Barcelona

**EFFECTO DE DOSIS GÉNICA DE DYRK1A (MINIBRAIN) EN
EL PROCESO NEURODEGENERATIVO ASOCIADO AL
ENVEJECIMIENTO: UN ESTUDIO CON RATONES
GENÉTICAMENTE MODIFICADOS**

**Memoria presentada por María Martínez de Lagrán Cabredo para optar
al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona**

**Realizada en el Centro de Regulación Genómica (CRG) bajo la
dirección de la Dra Mara Dierssen Sotos**

**Tesis adscrita al Departamento de Biología Celular y
Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina
Universidad de Barcelona**

**VºBº de la directora de tesis
Mara Dierssen Sotos**

**VºBº del tutor de tesis
Jordi Alberch Vie**

**La interesada
María Martínez de Lagrán Cabredo**

*A mis padres
A la memoria de mi abuela Manuela*

*A las personas con síndrome de Down a cuyo bienestar han
de ir dirigidas como fin último nuestras investigaciones*

Después de varios años ha llegado el momento de plasmar el trabajo realizado en esta Tesis y recordar a todas las personas que de forma directa o indirecta lo han hecho posible.

Siempre he creído que en el momento de los agradecimientos deben aparecer sólo aquellas personas que han aportado su granito de arena en el terreno personal ya que a nivel profesional su hueco lo tienen en las publicaciones científicas. Sin embargo durante este tiempo he tenido la oportunidad de realizar diversas colaboraciones que han aportado interesantes resultados a este trabajo, pero a su vez, me han permitido establecer una amistad y por ello, también se han colado en este apartado. Por tanto quiero agradecer a todos ellos sus consejos tanto en lo profesional como en lo personal, y concretamente a Miguel Morales (IDIBAPS, Barcelona) su delirio contagioso ante los resultados de FRAP, a Paco Artigas y Analía Bortolozzi (IDIBAPS, Barcelona) por su entusiasmo en los experimentos de microdiálisis, a Ger Ramakers (The Netherland Institut for Brain Research, Amsterdam) por introducirme en el mundo de los cultivos y su estoicismo ante mi terrible inglés, y a Olga Millán (IAT, Barcelona) por su paciencia con mis ratones sin cola y con la que compartí muchas horas de conversación frente al micro-PET.

A parte de mí, hay una persona que ha trabajado en esta Tesis un montón, desde el primer día que pise el laboratorio hasta el momento de escribir las últimas frases. Gracias Mara por haber depositado tu confianza en mí desde el principio sin conocerme de nada y tras nuestra primera extravagante entrevista. Aunque no siempre es posible seguir tu frenético ritmo, aparte de lo que he aprendido a tu lado y las oportunidades que me has brindado para poder desarrollar y crecer en mi carrera científica, sobretodo quiero agradecerte tu comprensión y consejos en los momentos en los que mi situación personal no me permitía rendir como nos hubiera gustado. Gracias por seguir confiando en mí.

La dedicación a la investigación resulta apasionante y a la vez muy absorbente, por ello, el número de horas que inviertes resulta incalculable. Por fortuna, la abstracción absoluta de la realidad no es posible gracias a las personas que vas encontrando en tu camino.

Los inicios de este Tesis me llevan al desanjelado IRO donde, sino hubiera sido por un grupo de personas muy especial posiblemente ahora mismo no estaría escribiendo estas líneas. Un recuerdo muy especial para la conjura de brujos con la temperamental Vasso a la cabeza, siempre animándome desde la distancia y llena de valiosos remedios; el entrañable gruñón, Emilio fiel amante del zinc con el que, entre otras cosas, compartí clases magistrales de cocina china... y a Ana, tertuliana de interminables cafés. Por distintos motivos nos separamos y ahora quiero agradecer vuestra amistad y que no hayamos perdido el contacto.

Del IRO pasamos al CRG y con el cambio, las mejoras de calidad de vida fueron insuperables, disfrutar de la vista del mar en vez de sortear la autopista no tiene precio. Del IRO me vine con Silvia, el pimpollo, a la que quiero agradecer su amistad llena de chismorreos interrumpidos ante el microscopio, por ese estilazo con las raquetas, por compartir su gran sentido del humor y estar siempre atenta a mis problemas dentro y fuera del laboratorio.

Puede que no haya formado parte del grupo más brillante y con el mejor nivel de inglés del CRG, siempre en el punto de mira, sin embargo creo que posee una gran calidad humana. Con ellos he compartido experimentos, he hablado, he llorado, he disfrutado, he comido, he discutido y sobretodo, he reído un montón. Por ello les considero algo más que compañeros de trabajo, son buenos amigos.

Gracias a Laura por transmitirme su vitalidad y ganas de emprender nuevos rumbos y a Judith por mostrarme su singular sentido de entender la vida, siempre joven.

Nohe, nuestra reivindicadora técnico todo terreno con la que inicie mi andadura por el CRG descubriendo el desarrollo de las ratas. Para la reina del criostato y las inmunos, gracias por tu gran amistad y el chiste de las medias. Al final parece que tu mami se doctora...

Gloria, el pollet de Candasnos, pura dinamita, mi psicóloga personal siempre llena de consejos y rebosando alegría. Gracias por no dejar que me despeñara por Benasque y por estar muy cerca cuando las cosas no están en su mejor momento.

Carla, la última discípula en llegar y despacito, poc a poc. Aunque lo nuestro no fue danzar libremente, gracias por esa capacidad de dialogar y tu positivismo ante la vida, eres única.

Nasi, fotógrafo incansable y siempre dispuesto a echar una mano para lo que sea. , gracias por tu gran amistad incondicional, por esas conversaciones sobre lo divino y humano frente al mar. Por estar ahí.

Xavi, el más tozudo y cabezota, ladrón furtivo de preparaciones y protocolos pero de lo más bonachón y leal. Gracias por compartir tus experiencias de pijamas increíbles y por tu capacidad de saber escuchar.

Alex, tan grande como buenazo, siempre desgastándome el nombre, gracias por compartir discusión de resultados, risas y momentos gloriosos de peineta y faralá. Siempre nos quedara la duda de la longitud del axón...

Por último, gracias a la incansable Nati por cuidar a mis ratoncitos sin los que, claramente, esta Tesis no hubiera sido posible. Y a Jon, por nuestros intercambios estabularios tanto de legendarios ratones como de confianzas y chascarrillos. Gracias al resto de personajes que pululan por los laboratorios con los que comparto los momentos de distensión laboral, sois muchos y la lista se alargaría demasiado.

Fuera del laboratorio también he recibido el apoyo y el acompañamiento, aunque en la mayoría de los casos con muchos kilómetros de separación, de los amigos de siempre que han ido siguiendo mi evolución sin comprender demasiado porque pasaba horas y horas viendo nadar ratones. A Askoa, Nuria, Olga, Olatz, Sonia y Javi os agradezco las risas compartidas, las salidas nocturnas y vuestra amistad incondicional y atemporal.

Gracias David por los buenos momentos que hemos compartido. A pesar de los pesares, tú eres la persona que mejor sabe el esfuerzo que ha supuesto esta Tesis y has estado ahí en los momentos de desaliento animándome a seguir y no tirar la toalla relativizando mis problemas. Gracias por tu ayuda y cariño. Gracias a Narciso y María por abrirme siempre las puertas de su casa.

Finalmente existe un grupo de personas que no permiten que pierda el contacto con la realidad y a las que necesito y quiero un montón. Quiero agradecer el cariño que recibo de mis hermanas Marta e Isabel, por esas visitas anuales a mi vida y por que haya donde estemos seguiremos caminando juntas. Gracias a mis padres por comprender la apuesta que hacía en el momento de alejarme de ellos y por apoyarme en todo momento a pesar del tiempo transcurrido. Gracias por vuestra ayuda, por seguir estando a mi lado y sentirlos muy cerca.

Por último durante los años en los que se ha desarrollado esta Tesis por desgracia han desaparecido dos personas muy especiales, que han sido y seguirán siendo un importante referente para mí. Su pérdida marcó profundamente el desarrollo de mi trabajo. De mi tío Félix admiraré siempre su constancia en el trabajo y su grandeza. Con mi abuela Manuela tenía un vínculo muy especial y la ternura que desprendía al verme aparecer siempre me alentaba a continuar. Un recuerdo muy especial para ellos, os echo mucho de menos.

Para la realización de esta Tesis Doctoral he disfrutado entre los años 2000 y 2004 de una beca para la Formación de Personal Investigador otorgada por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF99-0092-CO2-01 y 02) y durante el año 2005 de una beca asociada al proyecto “Efectos de la sobreexpresión de genes en el síndrome de Down y en el trastorno de ansiedad, y estudio de la predisposición a la trisomía 21 y la mutación genómica DUP25”, otorgada por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2002-00799).

Asimismo, la infraestructura del laboratorio de conducta y del laboratorio de experimentación molecular y el material utilizado han sido financiados por la Fundación CIEN, Foundation Jerome Lejeune (R5046-1), el Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 2001-1231 y SAF2002-00799) y la Comunidad Europea (CEC DOCE QoL-2001-3-15 November 2000-Quality of Life).

PRESENTACIÓN

“La mejor manera de disipar muchos de nuestros miedos irracionales al enfermar descansa, sin duda, en reconocer en que consiste, precisamente, la enfermedad” (Vicente Madoz. Los miedos del hombre moderno)

En el grupo de Análisis Neuroconductual del Programa Genes y Enfermedad del CRG, estamos interesados en los factores genéticos y los mecanismos patogénicos responsables del retraso mental en el síndrome de Down (SD). En los últimos años se viene proponiendo una visión de esta patología como un proceso neurodegenerativo que se instaura desde estadios postnatales tempranos para finalmente desembocar en un envejecimiento prematuro, modelo de estadios predemenciales de la enfermedad de Alzheimer (EA). Nuestro grupo viene trabajando en los últimos años en diferentes genes candidatos. Entre ellos, Dyrk1A se ha revelado como un gen candidato para SD debido a que: 1) se expresa durante el neurodesarrollo de forma ubicua; 2) está sobreexpresado en el SD; 3) varios de sus sustratos de fosforilación participan en neurogenesis, neuroplasticidad o neurodegeneración. En base a estos hallazgos formulamos la hipótesis de que cambios de dosis de Dyrk1A podrían afectar a la correcta función de estructuras cerebrales concretas dando lugar a los rasgos fenotípicos característicos del SD. La aproximación experimental que se utilizó fue la generación de modelos de ratón con cambio de dosis de Dyrk1A.

Este trabajo aborda el estudio de la contribución de Dyrk1A en el establecimiento de procesos neurodegenerativos asociados al SD y al envejecimiento no patológico. Se trata de un gen situado en la denominada región crítica de SD, que codifica para una serina treonina quinasa de función no bien determinada. Proponemos que cambios en los niveles de expresión de esta proteína en conjunción con otros factores genéticos, epigenéticos y ambientales, podrían estar involucrados en el desarrollo y progresión del SD, un proceso patológico de carácter neurodegenerativo caracterizado por el curso progresivo de los síntomas en especial durante los primeros años de vida, reflejo de la alteración paulatina de una parte o partes del sistema nervioso. En el adulto con SD, los cambios neurodegenerativos presentan características diferenciales respecto a las observadas en la EA, pese a que comparte sus signos neuropatológicos. Estas diferencias se deben a que el proceso neurodegenerativo es consecuencia específica de las alteraciones en el neurodesarrollo y la plasticidad neuronal.

Esta Tesis aborda:

- 1) La descripción y caracterización del impacto de cambios en los niveles de expresión de *Dyrk1A* en el proceso neurodegenerativo asociado a la edad utilizando como aproximación experimental modelos de ratón genéticamente modificados
- 2) Además, se estudian los aspectos mecanísticos que posiblemente subyacen a estos procesos, tanto a nivel neuroquímico, centrándonos en dos sistemas de neurotransmisión específicamente relacionados con función cognitiva, como a nivel celular, donde principalmente abordamos aspectos relacionados con neuroplasticidad. Para realizar esta segunda parte de la tesis se estableció una colaboración con el Dr Ger Ramakers en The Netherland Institut for Brain Research en Amsterdam. La doctoranda realizó una estancia de 2 meses en su laboratorio para iniciarse en las técnicas de análisis morfométrico en cultivo celular primario. También se estableció una colaboración con el Dr Francesc Artigas (IDIBAPS, Barcelona) para la realización de los experimentos de microdiálisis y con el Dr Miguel Morales (IDIBAPS, Barcelona) para los estudios de la dinámica de actina.

Este trabajo constituye la presente Tesis Doctoral cuyos resultados han sido parcialmente publicados en cuatro manuscritos, tres de ellos ya publicados y uno aceptado con revisión menor, y dos más en preparación. Además la doctoranda ha colaborado en otros proyectos del laboratorio y ha participado en la redacción de tres artículos de revisión

ÍNDICE



PRESENTACIÓN	13
ÍNDICE	17
INTRODUCCIÓN	25
1. PATOLOGÍA HUMANA DEPENDIENTE DE DOSIS GÉNICA.....	27
2. EL SÍNDROME DE DOWN.....	27
3. EL SÍNDROME DE DOWN COMO PROCESO NEURODEGENERATIVO.....	33
3.1. El proceso neurodegenerativo postnatal en el síndrome de Down.....	33
3.2. Proceso neurodegenerativo relacionado con el envejecimiento en el síndrome de Down.....	36
3.3. El síndrome de Down como modelo de estadios predemenciales de la enfermedad de Alzheimer.....	38
3.4. Disfunción colinérgica en la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down.....	41
3.5. El proceso neurodegenerativo en el SD: consecuencias cognitivas y la aparición de demencia	45
4. GENES CANDIDATOS IMPLICADOS EN LOS PROCESOS NEURODEGENERATIVOS PRESENTES EN SÍNDROME DE DOWN.....	47
4.1. Generación de modelos murinos del cromosoma 21.....	47
4.2. Dyrk1A como gen candidato para síndrome de Down y enfermedad de Alzheimer.....	55
4.2.1. Patrón de expresión de Dyrk1A en SNC.....	58
4.2.2. Papel de Dyrk1A en el neurodesarrollo.....	59
4.2.3. Papel de Dyrk1A en procesos cognitivos.....	60
4.2.4. Papel de Dyrk1A en la función motora.....	61
4.2.5. Papel de Dyrk1A en el proceso neurodegenerativo.....	61
4.2.6. Consecuencias de la manipulación in vivo del gen Dyrk1A.....	62
5. NEUROPLASTICIDAD IN VIVO EN EL SÍNDROME DE DOWN.....	64
5.1. Efectos conductuales del enriquecimiento ambiental.....	66
5.2. Efectos del enriquecimiento en modelos murinos de enfermedades neurológicas de SNC.....	67

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	71
1. HIPÓTESIS.....	73
2. OBJETIVOS.....	74
MATERIALES Y MÉTODOS	75
1. MODELOS ANIMALES	77
2. CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL.....	78
2.1. Pruebas neurosensoriales y sensoriomotoras.....	80
2.2. Estudio de actividad y conducta relacionada con ansiedad.....	85
2.3. Estudio del aprendizaje y memoria.....	87
3. CARACTERIZACIÓN NEUROMORFOLÓGICA.....	91
3.1. Inmunohistoquímica.....	91
3.2. Estereología.....	93
3.3. Inmunoensayo (ELISA).....	94
4. CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA EN LOS MODELOS CON DIFERENTES NIVELES DE EXPRESIÓN DE DYRK1A	95
5. TÉCNICAS DE IMAGEN <i>IN VIVO</i> : MICRO-PET.....	97
6. CULTIVOS PRIMARIOS CORTICALES EN EL MODELO DE SOBREEXPRESIÓN DE DYRK1A.....	98
6.1. Preparación previa del material.....	98
6.2. Disección de cortezas embrionarias.....	99
6.3. Establecimiento del cultivo primario cortical.....	99
6.4. Transfección de cultivos primarios corticales.....	100
6.5. Inmuncitoquímica.....	101
6.6. Análisis morfométrico.....	102
6.7. Estudios de la dinámica de la actina en espinas.....	103
7. ESTUDIOS DE ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL EN EL MODELO DE SOBREEXPRESIÓN DE DYRK1A.....	104
8. ANALISIS ESTADÍSTICO.....	105

RESULTADOS	107
1. ALTERACIONES NEUROLÓGICAS Y COMPORTAMENTALES ASOCIADAS A LA EDAD EN UN MODELO MURINO DE HAPLOINSUFICIENCIA DE DYRK1A (DYRK1A+/-).....	109
1.1. El ratón Dyrk1A+/- presentó alteraciones en la fuerza muscular y la marcha que se acentuaron con el envejecimiento	109
1.1.1. Curva de supervivencia en el ratón Dyrk1A+/-.....	109
1.1.2. Deterioro neurológico en el ratón Dyrk1A+/- con el envejecimiento.....	110
1.1.3. Actividad locomotora en el ratón Dyrk1A+/-.....	111
1.1.4. Cambios sensoriomotores en el ratón Dyrk1A+/- asociados a la edad.....	112
1.2. El modelo de haploinsuficiencia de Dyrk1A presentó alteraciones en el sistema dopaminérgico nigroestriatal	118
1.2.1. Análisis estereológico de los núcleos dopaminérgicos en el ratón Dyrk1A+/-.....	118
1.2.2. Inducción de catalepsia tras la administración de antagonistas dopaminérgicos en el ratón Dyrk1A+/-	120
1.2.3. Efecto de agonistas dopaminérgicos sobre la actividad en el ratón Dyrk1A+/-.....	121
1.2.4. Experimentos de imagen in vivo en el ratón Dyrk1A+/- tras la administración de un agonista dopaminérgico indirecto	122
2. ALTERACIONES NEUROLÓGICAS Y COMPORTAMENTALES ASOCIADAS A LA EDAD EN UN MODELO MURINO DE SOBREENPRESIÓN DE DYRK1A (TGDYRK1A).....	123
2.1. El ratón TgDyrk1A presentó alteraciones en coordinación motora y una desorganización de la conducta motora.....	123
2.1.1. Curva de supervivencia en el ratón TgDyrk1A.....	123
2.1.2. Deterioro neurológico en el ratón TgDyrk1A con el envejecimiento.....	123
2.1.3. Cambios de la actividad locomotora y en ansiedad en el ratón TgDyrk1A con la edad	125
2.1.4. Modificaciones de los parámetros sensoriomotores en el ratón TgDyrk1A asociadas a la edad.....	128

2.2. El modelo de sobreexpresión de Dyrk1A presentó alteraciones poco relevantes en el sistema dopaminérgico nigroestriatal.....	134
2.2.1. Análisis estereológico de la Sustantia Negra pars compacta en el ratón TgDyrk1A.....	134
2.2.2. Inducción de catalepsia tras la administración de antagonistas dopaminérgicos en el ratón TgDyrk1A	136
2.2.3. Efecto de agonistas dopaminérgicos sobre la actividad en el ratón TgDyrk1A.....	137
2.3. El modelo de sobreexpresión de Dyrk1A presentó un deterioro cognitivo con el envejecimiento principalmente en la memoria reciente.....	137
2.3.1. Declive del aprendizaje y memoria visuo-espacial asociado a la edad en el ratón TgDyrk1A.....	137
2.3.2. Efecto de la edad sobre la memoria reciente en el ratón TgDyrk1A	140
2.4. El modelo de sobreexpresión de Dyrk1A presentó una leve degeneración colinérgica con el envejecimiento	141
2.4.1. Análisis estereológico de los núcleos colinérgicos del prosencéfalo basal en el ratón TgDyrk1A.....	142
2.4.2. Determinación de la concentración de NGF en el ratón TgDyrk1A.....	144
2.5. El modelo de sobreexpresión de Dyrk1A presenta alteraciones en la neuritogénesis y afectación en la dinámica de la actina de las espinas dendríticas.....	145
2.5.1. Caracterización de la neuritogénesis en el ratón TgDyrk1A.....	148
2.5.2. Estudio de la dinámica de la actina en las espinas dendríticas del ratón TgDyrk1A.....	149
2.6. El enriquecimiento ambiental no produjo efectos beneficiosos en el modelo de sobreexpresión de Dyrk1A	149
2.6.1. Efecto del enriquecimiento sobre la actividad exploratoria en el ratón TgDyrk1A.....	149
2.6.2. Efecto del enriquecimiento sobre el aprendizaje y la memoria visuo-espacial en el ratón TgDyrk1A.....	150
2.6.3. Efecto del enriquecimiento sobre la memoria reciente en el ratón TgDyrk1A.....	154

2.6.4. Incremento de la actividad metabólica cerebral como consecuencia del enriquecimiento ambiental.....	155
DISCUSIÓN.....	157
1. PERFIL DE DETERIORO COMPORTAMENTAL ASOCIADO A LA EDAD EN MODELOS DE MODIFICACIÓN DE EXPRESIÓN DE DYRK1A.....	161
1.1. Alteraciones neurológicas y su deterioro asociado a la edad.....	162
1.1.1. Dyrk1A +/-	162
1.1.2. TgDyrk1A.....	164
1.1.3. El papel de Dyrk1A en las alteraciones neurológicas asociadas al envejecimiento.....	167
1.2. Cambios en la actividad motora y su deterioro asociado a la edad.....	167
1.2.1. Dyrk1A +/-	168
1.2.2. Posible participación del sistema dopaminérgico en la hipoactividad de Dyrk1A +/-.....	169
1.2.3. TgDyrk1A.....	171
1.2.4. Posible participación del sistema dopaminérgico en la hiperactividad de TgDyrk1A	172
1.2.4. El papel de Dyrk1A en la actividad motora y su deterioro asociado al envejecimiento.....	174
1.3. Aspectos emocionales.....	174
1.4. Aspectos cognitivos y su deterioro con la edad.....	175
1.4.1. Memoria reciente.....	175
1.4.2. Posible implicación del sistema colinérgico en los trastornos de memoria reciente asociados a la edad.....	176
1.4.3. Memoria visuo-espacial.....	177
1.4.4. Impacto de la sobreexpresión de Dyrk1A sobre los mecanismos moleculares y celulares implicados en memoria y aprendizaje.....	179
2. IMPACTO DE LA SOBREENEXPRESIÓN DE DYRK1A SOBRE LOS MECANISMOS MOLECULARES Y CELULARES IMPLICADOS EN MEMORIA Y APRENDIZAJE.....	184

CONCLUSIONES	191
BIBLIOGRAFÍA	195
ANEXO	221
1. ABREVIATURAS.....	223
2. ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS.....	226

INTRODUCCIÓN



1. PATOLOGÍA HUMANA DEPENDIENTE DE DOSIS GÉNICA

La aneuploidía, se define como un número anormal de copias de una región genómica, y es una causa común de enfermedades genéticas humanas. Clásicamente, el término aneuploidía se restringía a la presencia de copias supranumerarias (trisomías) o pérdida (monosomía) de cromosomas completos, pero esta definición se ha extendido para incluir deleciones o duplicaciones de regiones subcromosómicas o de genes únicos. En las monosomías se incluyen las haploinsuficiencias, en las que una única copia de un gen o un elemento funcional genómico no es suficiente para que lleve a cabo su función normal. La importancia de la aneuploidía con frecuencia no se pondera debido a que la mayor parte de sus efectos se producen durante el periodo embrionario o fetal.

El prototipo de enfermedad por exceso de material genético es la trisomía del par 21 o síndrome de Down (SD) y algunos síndromes de microdelección constituyen los modelos más frecuentes de monosomía.

La aneuploidía se relaciona con la alteración de los niveles de expresión génica de genes específicos, denominados por este motivo genes dosis-sensibles, pero su patogenia molecular precisa prácticamente no se conoce. La identificación de genes con un impacto fenotípico de cambio de dosis es crucial para comprender no solamente estos síndromes sino variantes de número de copia presentes en la población general con posibles consecuencias patogénicas. Además, permitirá posiblemente identificar dianas moleculares con potencial terapéutico.

2. EL SÍNDROME DE DOWN

El SD es la autosomopatía más común, con una frecuencia de 1:800-1000 de todos los recién nacidos, y constituye la principal causa genética de retraso mental y alteraciones cardíacas congénitas (Roizen y Patterson 2003). La prevalencia del SD aumenta con la edad materna, y de forma exponencial por encima de los 35 años, si bien dos tercios de los casos se producen en mujeres más jóvenes. En 1866 Sir John Langdon Haydon Down describió por primera vez este síndrome (Down 1866) pero su origen genético no se estableció hasta el año 1959, cuando Lejeune

demonstró la presencia en trisomía completa o parcial del cromosoma 21 (Lejeune et al. 1959), que se traduce en una sobreexpresión de las proteínas codificadas por genes localizados en este cromosoma. Sin embargo, ha sido en los últimos años, a partir de la generación de modelos en ratón cuando la investigación básica en SD ha experimentado los avances más importantes (Esquema 1).

Esquema 1. Hallazgos históricos del síndrome de Down. Adaptado de Patterson y Costa, 2005

AÑO	EVENTO
1866	John Langdon Down describe el síndrome de Down
1876	Se describe la asociación entre síndrome de Down y senilidad prematura
1932	Waardenburg sugiere por primera vez que el síndrome de Down pueda deberse a una trisomía por no-disyunción
1932	Davenport sugiere que las irregularidades de los cromosomas puedan provocar discapacidad intelectual, incluida la del síndrome de Down
1959	Jérôme Lejeune descubre que las personas con síndrome de Down poseen tres cromosomas 21 (HSA21)
1960	Se describe la presencia de translocaciones en el síndrome de Down (Polani)
1961	Se describe la presencia de mosaicismo en el síndrome de Down (Clarke)
1969	Se describe la presencia de un chimpancé con rasgos de síndrome de Down; posee trisomía de su cromosoma 22 (McClure), el cual contiene regiones conservadas de genes idénticos a los del HSA21
1970	Caspersson postula que el material genético triplicado en el HSA21, responsable del síndrome de Down, se encuentra en la porción distal del brazo largo del cromosoma
1973	Son identificados los 2 primeros genes del HSA21: SOD1(superóxido dismutasa) y IFNAR1 (un receptor de interferón)
1974	Se producen ratones con trisomía de su cromosoma 16 (MMU16)
1979	Por primera vez se localiza un gen del HSA21 en el cromosoma 16 de ratón: se trata del gen SOD1 (Francke y Taggart)
1980	El ratón con trisomía 16 (Ts16) es propuesto como modelo animal de síndrome de Down
1985	Se aísla el primer gen del HSA21: el SOD1
1987	Se consigue el primer ratón transgénico con un gen del HSA21: SOD1 (Epstein)
1987	Se encuentra en el HSA21 un gen que puede originar la enfermedad de Alzheimer: el APP
1990	Se produce el primer ratón con trisomía 16 segmentaria que resulta viable, y se convierte en modelo de síndrome de Down: Ts65Dn
2000	Se publica la secuenciación del HSA21 y se completa su primera anotación
2001	Se describen bloques de haplotipos en el HSA21
2001	Se descubre un transcriptoma expandido en los cromosomas HSA21 y HSA22 (Kampa)

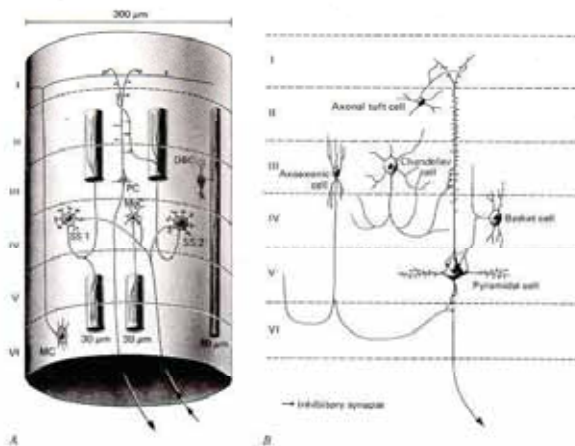
Entre las personas que tienen SD existe una gran variabilidad fenotípica de forma que se han descrito hasta 300 rasgos fenotípicos diferentes asociados a esta cromosomopatía que se presentan en grado variable siendo la aparición de algunos de ellos dependientes de la edad (Coleman 1978). Así, algunos rasgos como las cataratas, la pérdida de audición, el hipotiroidismo o el prolapso de la válvula mitral

se presentan en la edad adulta (Pueschel 1990). Entre los rasgos típicos del SD destacan el retraso mental, las malformaciones craneofaciales, las alteraciones cardiacas y digestivas, una elevada incidencia de leucemia aguda, el retraso del desarrollo neuromotor en niños, la disfunción auditiva y visual y trastornos metabólicos-hormonales. Existe además una tendencia a presentar de forma prematura signos neuropatológicos de enfermedad de Alzheimer (EA), con o sin manifestaciones clínicas de demencia.

En nuestro grupo estamos interesados en la patogenia de la discapacidad intelectual y de su deterioro con la edad. El término *discapacidad intelectual* hace referencia a limitaciones significativas no sólo en el funcionamiento intelectual sino también en la conducta adaptativa manifestada en las habilidades sociales y cotidianas que aparecen antes de los 18 años (AAMR, 2002). Por desgracia, el índice psicométrico más utilizado para categorizar la discapacidad intelectual, el coeficiente intelectual, es una medida muy poco descriptiva de los ámbitos de disfunción específica o de las capacidades cognitivas o adaptativas reales de una persona. En las personas con SD, el coeficiente intelectual puede variar entre 40 y 80, pero lo más frecuente es que oscile alrededor de 50-60, siendo excepcionalmente superior a 70, por lo que se puede hablar de una discapacidad intelectual moderada (Anneren y Pueschel 1996). Estas cifras, sin embargo, nada dicen de otras habilidades de estas personas ni de su capacidad para desarrollar diversas exigencias vitales. Por otra parte y debido a la creciente integración social y laboral de estas personas, cada vez resulta más necesario desarrollar nuevas herramientas de medida, mucho más precisas y adaptadas a la condición particular de esta patología. El retraso mental asociado al SD se caracteriza por un retraso del desarrollo psicomotor, alteraciones de la memoria y del lenguaje y defectos cognitivos en el procesamiento auditivo-verbal, que con toda probabilidad dependen de las anomalías estructurales y funcionales presentes en el sistema nervioso central, pudiendo dar como resultado diversos tipos y grados de disfunción cognitiva y neurológica. Centrándonos en los aspectos neuropatológicos del SD, macroscópicamente es frecuente apreciar una reducción en el tamaño del cerebro en su conjunto, con hipoplasia de los lóbulos frontal y occipital y, en el 50% de los casos reducción de los lóbulos temporales, del hipocampo y del cerebelo, así como del número y profundidad de la cisuras (Raz et al. 1995; Jernigan et al. 1993,

revisado en Teipel y Hampel 2006), lo que sugiere una reducción en la superficie cortical. Estas estructuras son fundamentales para el procesamiento y almacenamiento de información, la memoria visuo-espacial o la coordinación motora, por lo que existe una repercusión funcional en estos ámbitos en los pacientes con SD.

En concreto en la corteza cerebral se han descrito alteraciones histológicas que afectan a tipos celulares concretos, con posibles repercusiones en el procesamiento e integración de la información y en la sincronización de la actividad de las minicolumnas. Éstas son unidades funcionales cuya existencia fue postulada por Cajal constituidas por miles de neuronas conectadas entre sí que intervienen en la determinación del flujo de información y la toma de decisiones (Esquema 2).

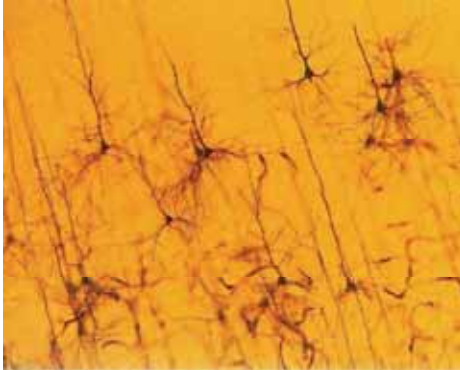


Esquema 2. Representación esquemática de una minicolumna de la corteza cerebral

Las alteraciones celulares observadas en la corteza cerebral afectan a las neuronas granulares y piramidales. Las neuronas granulares son interneuronas cuyo número se encuentra significativamente reducido en determinadas áreas de la corteza de cerebros con SD. Este tipo celular constituye un 15 a 20% de las neuronas corticales, y se caracteriza por el confinamiento de su axón dentro de la propia corteza, por lo que participa en circuitos intracorticales y establece sinapsis con las neuronas piramidales que proyectan fuera de la corteza cerebral, modulando por tanto la información de salida de la misma, por lo que la reducción de su número podría alterar el flujo de información eferente.

Las células piramidales constituyen el tipo celular más frecuente en la corteza cerebral, y presentan una citoarquitectura definida por un largo árbol dendrítico apical y otro basal, y un axón que proyecta hacia regiones subcorticales (DeFelipe y

Farinas 1992) (Esquema 3). Se trata de neuronas de proyección excitadoras de manera que toda la información procesada sale de la misma a través del axón hacia la sustancia blanca para alcanzar otras áreas corticales o subcorticales



Esquema 3. Tinción de Golgi de las neuronas piramidales corticales

La integridad estructural del árbol dendrítico y de su organización en el espacio es un elemento crucial en la integración de la información y la toma de decisión a nivel celular, de forma que recientemente H. Makram, un investigador que trabaja en la modelización funcional de la neocorteza (Cajal Centenary Conference, Barcelona, 2006), ha propuesto una “Revolución Copernicana” en la concepción de la organización de la neocorteza, en la

que pasamos del modelo *somatocéntrico* al *dendritocéntrico*. Por tanto, las alteraciones dendríticas propias de la discapacidad intelectual en muchos procesos que cursan con retraso mental se revelan cada vez más como el elemento causante de éstas.

Las espinas dendríticas son especializaciones de membrana que conforman el elemento postsináptico en la mayor parte de las sinapsis excitatorias cerebrales y regulan la duración y alcance de flujos de calcio producidos por la activación glutamatérgica en estas sinapsis. La espina está formada por una expansión denominada cabeza que conecta con la dendrita a través de un estrechamiento o cuello. Esta geometría tiene una implicación funcional, de forma que la morfología de la espina refleja su función. En este sentido el volumen de la cabeza es directamente proporcional al número de receptores postsinápticos siendo determinante en la regulación de la transmisión sináptica, mientras que la estructura del cuello ejerce una influencia directa sobre la señalización del calcio en la dendrita. Esta arquitectura depende de la estructuración del citoesqueleto filamentososo, que a su vez determina los constantes cambios de forma en la espina, de forma que los procesos de polimerización y depolimerización de actina son cruciales a la hora de determinar su estabilización y plasticidad.

Una característica patognomónica del SD es la alteración de la microarquitectura de las células piramidales de la corteza cerebral. Se ha observado una reducción de la complejidad y tamaño del árbol dendrítico, así como disminución en el número y alteración de la estructura de las espinas dendríticas. En el SD la morfología de las espinas muestra rasgos distintos que en los cerebros sanos, siendo anormalmente largas y sinuosas o, por el contrario muy cortas (Marin-Padilla 1976; Purpura 1974; Fabregas y Ferrer 1983), alteraciones que muy posiblemente se correlacionan con afectación de los procesos electrofisiológicos subyacentes al aprendizaje y la consolidación de la información, a través de modificaciones estructurales, como pueden ser la potenciación a largo plazo (LTP, long term potentiation) y la depresión a largo plazo (LTD, long term depression). Parte de estas alteraciones se han podido apreciar en áreas cerebrales como la corteza, el hipocampo, y el cerebelo, es decir, regiones que tienen por función almacenar, recapitular, e integrar la información para, a partir de ahí, organizar funciones complejas como la memoria, la abstracción, la deducción, ó el cálculo. Por tanto, estas alteraciones microestructurales, posiblemente originadas durante el desarrollo postnatal, condicionarán sin duda una alteración en el flujo de información intracortical y cortico-subcortical, produciendo como consecuencia alteraciones en la capacidad de procesamiento e integración de la información. Por otra parte se han descrito alteraciones neuroquímicas en algunas vías de señalización intracelular (Lumbreras et al. 2006) implicadas en aprendizaje y memoria como la cascada de adenilil ciclasa y fosfolipasa C, que aparecen tanto en el SD con en la EA. Estas alteraciones en las espinas también se aprecian en los modelos trisómicos desarrollados en ratón (ver apartado 4.1). Cuando se estudia mediante microscopía electrónica el aparato receptor de la neurona (Kurt et al. 2000; 2004), se observa que la densidad sináptica se encuentra reducida en determinadas áreas cerebrales y la morfología de la sinapsis muestra alteraciones como son la disminución de la longitud pre-postsináptica, así como el área de contacto sináptico (Wisniewski et al. 1985).

3. EL SÍNDROME DE DOWN COMO PROCESO NEURODEGENERATIVO

Una de las preguntas clave en el SD se refiere al origen de las alteraciones neuropatológicas que hemos descrito. Dada la relativa integridad de la estructura histológica del cerebro en el momento del nacimiento y la presencia de los fenómenos neurodegenerativos a lo largo de toda la vida de las personas con SD, se viene proponiendo que se trata de un proceso patológico de carácter neurodegenerativo. Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un amplio capítulo dentro de la patología neurológica. Bajo este epígrafe se incluyen un grupo de enfermedades de causa conocida o desconocida y que tienen como atributo común el curso progresivo de los síntomas, reflejo de la desintegración paulatina de una parte o partes del sistema nervioso. Todas ellas presentan algunas características clínicas comunes, en cuanto a que su inicio es insidioso, y su curso progresivo, sin remisiones.

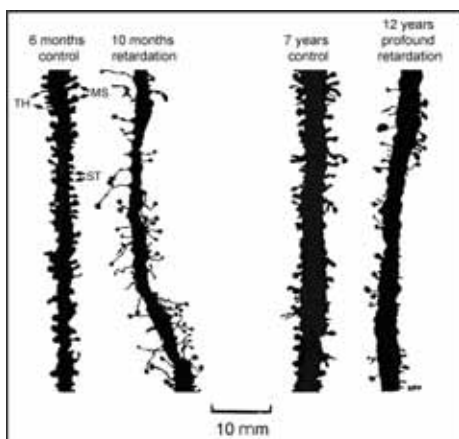
3.1. El proceso neurodegenerativo postnatal en el síndrome de Down

En una patología neurodegenerativa de las características del SD, es necesario conocer los factores estructurales y funcionales que pueden constituir elementos predisponentes de la neurodegeneración asociada a la edad. Más aún, con toda probabilidad los elementos celulares y los procesos de neuroplasticidad que se encuentran alterados durante el neurodesarrollo, también lo estarán en el adulto o determinarán las alteraciones funcionales del envejecimiento en estos pacientes.

En lo que se refiere a la histogénesis y al establecimiento de la circuitería cerebral, es apreciación generalizada de los diversos investigadores que han estudiado la morfología del cerebro en el SD que, durante la época fetal, no existen grandes diferencias morfológicas cuando se compara con el cerebro de un feto normal. Su tamaño y el peso son parecidos, el número de neuronas e incluso de espinas dendríticas también lo es (aunque existen amplias variaciones individuales), así como la configuración general o el grado de mielinización, aunque existen casos específicos en los que se pueden observar diferencias marcadas en celularidad en áreas concretas. Por lo tanto, puede decirse que, en general, las modificaciones durante la fase fetal no son sustanciales, aunque pueden apreciarse pequeñas

diferencias en los tiempos en que se van estableciendo las diferentes capas o láminas de algunas áreas de la corteza cerebral, y se detectan áreas de microdisgenesia, que afectan a la organización histogenética de los mapas corticales. Se han descrito heterotopias neuronales en sustancia blanca en el cerebelo y el vermis cerebeloso, que han sido atribuidas a un retraso en la migración celular durante el desarrollo embrionario (revisado en Florez 1992). Así, el cerebro fetal de SD se caracteriza por una reducción del grosor y una laminación alterada de la corteza cerebral, y disminuciones de los índices proliferativos con consecuencias en la celularidad y la densidad sináptica.

A estas alteraciones se añade la disgenesia de las espinas dendríticas, caracterizada por una morfología anormal y una alteración de las propiedades de la membrana celular (Marin-Padilla 1976; Suetsugu y Mehraein 1980; Ferrer y Gullotta 1990). Estas alteraciones se empiezan a detectar sobre todo en las etapas finales del período fetal, pero la arquitectura neuronal es prácticamente normal en el momento del nacimiento.

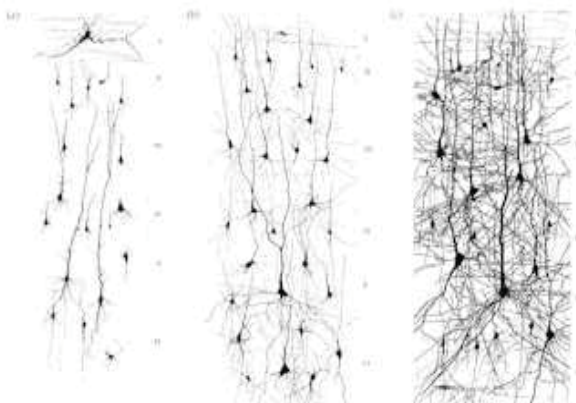


Esquema 4. Disgenesia de las espinas dendríticas en el retraso mental

Cuando realmente empiezan a marcarse las diferencias es en el período postnatal, produciéndose una progresiva degeneración de la longitud y número de ramificaciones dendríticas (Becker et al. 1986; Takashima et al. 1994; Vuksic et al. 2002; Prinz et al. 1997, revisado en Elston y DeFelipe 2002), por lo que se ha sugerido que las alteraciones morfológicas observadas son posiblemente resultado de déficit en el proceso de la remodelación postnatal de la circuitería cerebral con repercusiones a largo plazo. (Esquema 4).

Así, algunos tipos de neuronas presentan, en adultos con SD, una reducción en la complejidad del árbol dendrítico, disminución en la densidad de las espinas y disgenesia espinal (Marin-Padilla 1972; 1976; Takashima et al. 1989; Becker et al. 1991; 1993; revisado en Benavides-Piccione et al. 2004).

Como se ha mencionado en el apartado anterior, estos cambios en la microarquitectura afectan fundamentalmente a las células piramidales de la corteza cerebral, siendo durante los 2 primeros años de vida cuando se observa la reducción más drástica de su complejidad dendrítica (Takashima et al. 1989; Becker et al. 1991; Florez 1992). De hecho, en niños con SD menores de 6 meses las neuronas piramidales no presentan cambios en el árbol dendrítico, las ramificaciones o el número de espinas dendríticas, apareciendo en algunas regiones incluso en mayor número que en cerebros no afectados por el SD (Becker et al. 1986; Vuksic et al. 2002), aunque algunos estudios han encontrado ya reducciones en la complejidad neuronal a partir de los 2,5 meses, por lo que cabe pensar que el desequilibrio génico presente en el SD podría estar regulando o interfiriendo en el correcto desarrollo dendrítico en cualquiera de sus fases: generación, elongación o retracción de las ramificaciones dendríticas y las espinas. De hecho, en cerebros con SD se han encontrado niveles alterados de proteínas específicas relacionadas con estos procesos como la debrina (Shim y Lubec 2002). Así pues, los datos disponibles en la literatura apuntan a que las alteraciones en la microarquitectura celular observadas en el SD podrían deberse a deficiencias específicas en procesos del neurodesarrollo como la neuritogénesis, o la adquisición del fenotipo celular (Esquema 5), o bien, podrían depender a su vez de déficit en la neuroplasticidad sináptica, un proceso implicado en la modulación del número y la forma de las espinas (Lendvai et al. 2000; Toni et al. 1999), sugiriendo que el desequilibrio de dosis génica, posiblemente de algunos genes concretos, podría alterar la configuración tridimensional de las neuronas piramidales. Pero posiblemente el proceso neurodegenerativo pre- y postnatal no se restringe a la neuritogénesis, ya que estudios en cultivos primarios de cerebros con SD han demostrado también alteraciones en la proliferación celular y en procesos relacionados con neurodegeneración, como el incremento de la apoptosis dependiente de procesos oxidativos citotóxicos. Estos cambios degenerativos se observan también en neuronas no piramidales (Schulz y Scholz 1992; Prinz et al. 1997)



Esquema 5. Desarrollo de la circuitería de la corteza cerebral durante el periodo postnatal

3.2. El proceso neurodegenerativo relacionado con el envejecimiento en el síndrome de Down

Uno de los rasgos característicos del SD es el envejecimiento precoz, determinado por la aparición de un declive similar al de la población sin discapacidad intelectual pero a edades más tempranas. Este declive se observa cada vez con mayor frecuencia, debido al incremento de la esperanza media de vida de las personas con SD que actualmente se aproxima a los 60 años (Strauss y Zigman 1996).

El establecimiento de los parámetros afectados por el envejecimiento en pacientes con una disfunción mental previa, como sucede en el SD, resulta complejo. En los últimos años han aparecido una serie de estudios longitudinales que aportan información acerca de las alteraciones cognitivas dependientes de la edad (Burt et al. 1995; Prasher et al. 1998; Devenny et al. 1996; Hawkins et al. 2003), que han determinado que generalmente en el declive cognitivo asociado a la edad, los síntomas relacionados con el funcionamiento independiente (vestirse, comida, aseo) son los primeros en detectarse y los más notorios (Devenny et al. 1996; Prasher et al. 1998; Collacott 1992). Además, en los pacientes con SD se suelen registrar puntuaciones significativamente menores en la conducta adaptativa, orientación, memoria y habilidades visuo-espaciales asociados al declive cognitivo (Alexander et al. 1997; Burt et al. 2005).

A nivel neuromorfológico, estudios de resonancia magnética (RM) demuestran que en los pacientes adultos con SD se encuentran con más frecuencia que en la población general tres signos típicos del envejecimiento: atrofia, alteraciones en la sustancia blanca (Teipel et al. 2003) e hipodensidad de los ganglios basales. Se observa además una reducción del volumen del hipocampo y estructuras adyacentes al lóbulo temporal medio (Lawlor et al. 2001; Krasuski et al. 2002), así como en áreas de asociación corticales que pueden detectarse incluso antes de la instauración de demencia (revisado en Teipel y Hampel 2006). Por otro lado, aunque el número de estudios es menor, se ha descrito una reducción en el número de espinas de las dendritas apicales de las neuronas piramidales de corteza cingulada e hipocampo en cerebros de pacientes ancianos con SD pero sin patología relacionada con EA (Suetsugu y Mehraein 1980; Ferrer y Gullotta 1990).

¿Cuáles son los mecanismos patogénéticos implicados en el envejecimiento prematuro en el SD?. Una de las hipótesis más barajadas, y que aún se considera, indica que la exposición mantenida a niveles altos de estrés oxidativo durante la vida del individuo, daría lugar a la aparición y acumulación de radicales libres derivados del metabolismo oxidativo y ejercería una acción citotóxica. Uno de los sistemas de eliminación de radicales libres es el constituido por la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1). SOD1 está sobreexpresada en el SD y cataliza la dismutación de los radicales superóxido hacia H_2O_2 y O_2 constituyendo uno de los sistemas antioxidantes celulares más importantes (Fridovich 1995; Gutteridge y Halliwell 2000). En condiciones normales existe un equilibrio entre el mecanismo oxidativo y la actividad antioxidante, sin embargo cuando este equilibrio se desajusta, como en el SD, la acumulación de peróxido de hidrógeno no puede ser contrarrestada por la glutatión peroxidasa o la catalasa (Garber et al. 1979), reaccionando con metales para formar radicales que participan en la peroxidación lipídica, lo cual provoca el deterioro de las membranas celulares (Mirochnitchenko y Inouye 1996). Como resultado de la sobreexpresión de SOD1 se produce un incremento de la producción de aniones superóxido en las mitocondrias, haciendo que éstas sean menos eficaces con el tiempo y que aparezcan lesiones a nivel de los lípidos, proteínas y DNA mitocondrial. Estas alteraciones van deteriorando la integridad funcional celular determinando el envejecimiento y posterior muerte celular. Al igual que sucede con otras alteraciones funcionales, el estrés oxidativo

afecta negativamente al neurodesarrollo y a la supervivencia neuronal al estar presente desde fases tempranas del desarrollo en el SD (Busciglio y Yankner 1995; Pelsman et al. 2003). En concreto, algunos autores han propuesto que el estrés oxidativo presente durante el desarrollo en los cerebros de SD podría estar afectando a la migración neuronal durante la corticogénesis, lo que conduciría a las alteraciones en la laminación cortical. Más aún, se ha sugerido que la exposición a un estrés oxidativo intenso y continuado a lo largo de toda la vida, en los pacientes con SD pueda ser una de las causas del envejecimiento precoz.

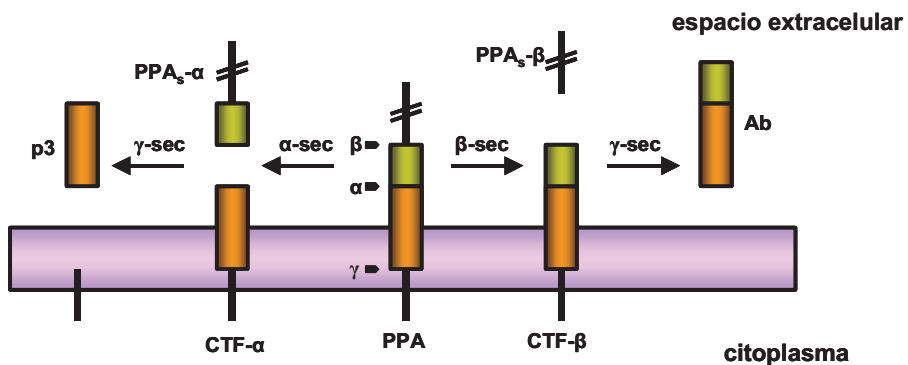
A pesar de que la hipótesis que relaciona el estrés oxidativo con el envejecimiento precoz en el SD es una de las más aceptadas, el origen de las alteraciones estructurales observadas en el cerebro durante el envejecimiento en el SD continúa siendo una incógnita. Otros mecanismos patogénéticos similares a los de EA como depósitos de amiloide y degeneración colinérgica, están también presentes en el SD.

3.3. El síndrome de Down como modelo de estadios predemenciales de la enfermedad de Alzheimer

Desde hace unos años se viene proponiendo la relación entre EA y SD, de forma que se considera que el SD podría ser un modelo biológico de estadios predemenciales de la EA. Esta proposición se sustenta en diversos hechos: a/ la implicación de genes del cromosoma 21 en la patogenia de enfermedades neurodegenerativas y EA; b/ el hecho de que las personas con SD desarrollen en un 100% las alteraciones neuropatológicas propias de la EA; c/ el deterioro cognitivo asociado a la edad en SD evoluciona en bastantes casos de forma temprana hacia una demencia clínica tipo EA. Por tanto, el estudio del proceso neurodegenerativo asociado a la edad en el SD puede aportar valiosa información para comprender parte de los mecanismos patogénéticos subyacentes a la EA.

Tanto en la EA como en el SD aparecen lesiones características denominadas **ovillos neurofibrilares** y **placas seniles**. Los ovillos neurofibrilares son lesiones intracelulares y están constituidos por agregados de Tau, una proteína asociada a microtúbulos (MAP), formando filamentos helicoidales. La función de Tau es facilitar la polimerización de tubulina y formación de microtúbulos que constituyen el

citoesqueleto y permiten el transporte vesicular a través del axón. En los ovillos neurofibrilares se observa una hiperfosforilación irreversible de Tau que impide su función normal a la vez que facilita su autoagregación en fibrillas. Por otra parte, las **placas seniles** son depósitos extracelulares insolubles cuyo principal componente es el péptido β -amiloide (Ab) procedente del metabolismo de la proteína precursora del amiloide (PPA). Existen dos vías diferentes de procesamiento de PPA: la vía no amiloidogénica, en la que interviene la proteasa α -secretasa, y la vía amiloidogénica, en la que por acción de β -secretasas y γ -secretasas se forma el péptido Ab de longitud variable. Los péptidos originados por esta vía con una longitud de 42 o 43 residuos, tienen una solubilidad limitada y forman autoagregados que constituyen las fibrillas insolubles que se localizan en los depósitos amiloides (Yankner 1996) (Esquema 6).



Esquema 6. Procesamiento celular de PPA (Adaptado de Canevari et al, 2004).

Cuando la PPA se procesa por la vía amiloidogénica por acción de α -secretasas y γ -secretasas se libera el extremo soluble carboxi-terminal de la proteína, posiblemente dentro de vesículas lisosomales para su posterior degradación. Sin embargo, una parte de la PPA es procesada por β -secretasas que al cortar la PPA liberan un fragmento C-terminal más largo que, a su vez, por la acción de la γ -secretasa, libera el péptido insoluble Ab responsable de la formación de las placas amiloides.

Aunque el mecanismo por el cual el péptido Ab provoca la degeneración neuronal está en discusión (Canevari et al. 2004), la hipótesis de la cascada amiloide en la EA es una de las más aceptadas (Hardy 2002). Atendiendo a la evolución temporal de las placas se sabe que, en una primera etapa, el β -amiloide se acumula de manera progresiva en densos agregados insolubles de alta toxicidad para las estructuras nerviosas vecinas dando lugar a la formación de placas difusas, que derivarán en la aparición de dendritas distróficas, glia reactiva, proteínas asociadas

a la reacción inflamatoria y daño neuronal y sináptico. En el establecimiento de la placa neurítica madura concurrirán asimismo la respuesta inflamatoria local, la alteración de la homeostasis metabólica e iónica neuronal y el estrés oxidativo. Todos estos procesos conducen a una espiral neurodegenerativa irreversible una vez se ha establecido, cuya consecuencia clínica es la pérdida sináptica y el déficit en los procesos de neurotransmisión, fundamentalmente colinérgica, que conducen a alteraciones en la adquisición y retención de información. Aunque se postula la agregación del péptido amiloide como causa de la patogénesis de la EA, el grado de demencia se correlaciona con la extensión de la degeneración neurofibrilar existente y con la pérdida sináptica, y no con el número de placas seniles. Por ello han surgido diversas teorías que apuntan a disfunción mitocondrial (Smith et al. 2002; Busciglio et al. 2002) o alteraciones de la vía endocítica (revisado en Nixon 2005) como promotoras de la amiloidogénesis en la EA.

Los pacientes con SD, presentan en edades tempranas lesiones tipo-Alzheimer cuya progresión temporal, con acumulación de Ab en placas difusas (primero Ab42 y posteriormente Ab40), y aparición de microgliosis y astrogliosis y finalmente de ovillos neurofibrilares, es representativa de la secuencia patogénica que ocurre en la EA (Armstrong 1994; Hyman et al. 1995). En el SD, en la segunda o tercera década de vida se detecta la presencia de proteína β -amiloide, aunque en casos aislados es ya observable antes de los 10 años (Gyure et al. 2001). Una década después, hacia los 35 años, aparecen las placas neuríticas y los ovillos neurofibrilares. La distribución de estas lesiones y su composición es similar a la descrita en la EA, si bien existen algunas diferencias morfológicas en las placas seniles presentes en el SD, que son más grandes que en la EA e incrementan su número con la edad, lo cual puede ser debido a un aumento en la producción más prolongado de la proteína beta amiloide (Hyman et al. 1995). Sin embargo, esta proteína es similar en ambas entidades patológicas, por lo que se ha postulado que la aparición de placas seniles en los pacientes con SD podría ser el resultado de la sobreexpresión desde el nacimiento del gen PPA localizado en el cromosoma 21(revisado en Sawa 2001; Head y Lott 2004), que daría lugar a una sobreproducción continuada de péptidos Ab. Estudios genéticos han establecido una estrecha correlación entre mutaciones de este gen y algunos casos de EA tipo familiar. Ciertamente, PPA no es el único gen que se ha involucrado en el

establecimiento de la EA. Mutaciones en los genes de las presenilina 1 (PSEN1, en cromosoma 14) y presenilina 2 (PSEN2, en cromosoma 1) se han relacionado a su vez con casos de EA tipo familiar (revisado en Thinakaran y Parent 2004; Menendez 2004). Aunque a estas proteínas se les han asociado diferentes funciones, existe evidencia que indicaría que poseen actividad γ -secretasa favoreciendo el depósito del péptido Ab (Wolfe et al. 1999). Finalmente, la presencia del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* (cromosoma 19) es un factor de riesgo de la EA y parece que se asocia a variaciones en la edad de inicio y en el número de placas (Corder et al. 1993) mientras que el alelo $\epsilon 2$ confiere cierta protección frente a la EA (Corder et al. 1994). Las distintas propiedades de unión de las isoformas de *APOE* al péptido Ab (Strittmatter et al. 1993) y a la proteína tau (Strittmatter et al. 1994) indicarían el mecanismo mediante el cual *APOE* interviene en el desarrollo de EA. A partir de los 25 años en el SD, las placas seniles son inmunoreactivas para *APOE*, que facilita la agregación de la proteína Ab en depósitos insolubles.

Precisamente debido a la clara relación entre SD y EA, no se descarta que el aumento constitutivo en la expresión de otros genes del cromosoma 21 pueda estar relacionado con la generación de las lesiones neurodegenerativas. En este grupo de genes se podría incluir el gen *SOD1* (codificante para la CuZn-superóxido dismutasa), ya que ratones transgénicos en los que el gen *SOD1* humano está sobrepresado muestran neuritas distróficas y estructuras anómalas en las terminaciones sinápticas (Groner et al. 1990) y el gen *BACE2*, una aspartil proteasa implicada en EA (Barbiero et al. 2003).

3.4. Disfunción colinérgica en la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down

La pérdida de memoria reciente es la alteración cognitiva más precoz en la EA debido a que los circuitos neurales implicados en aprendizaje y memoria son los que presentan un deterioro más temprano y más intenso en esta patología. Los principales circuitos afectados son las conexiones del hipocampo y la corteza entorrinal con el resto de la corteza cerebral y las vías colinérgicas del prosencéfalo basal anterior que proyectan hacia la corteza cerebral. En el SD se observa también esta degeneración colinérgica, siendo de nuevo una característica neuropatológica

común a ambas patologías. Desde hace tiempo se ha relacionado la degeneración colinérgica del prosencéfalo basal con el grado de afectación de la memoria en la EA, si bien esta “hipótesis colinérgica” ha sido cuestionada, debido al fracaso de las terapias basadas en la restitución de la neurotransmisión colinérgica (Perry et al. 1978). En este momento, si bien se acepta que la degeneración del sistema colinérgico tiene un papel, sobre todo en el deterioro de la memoria reciente, no se le otorga la relevancia que hace unos años tuvo. Sin embargo, la comprensión del mecanismo de citotoxicidad que afecta a poblaciones neuronales concretas, no solamente colinérgicas, sino también noradrenérgicas o dopaminérgicas nos podrá indicar el mecanismo patogénico de las alteraciones cognitivas y proporcionar información acerca de otros aspectos hasta ahora poco conocidos de la EA.

La hipótesis colinérgica de la EA se basaba en las múltiples evidencias clínicas y experimentales del papel que la inervación colinérgica ejerce en la memoria y el aprendizaje. Así, algunos autores han demostrado una depleción de marcadores colinérgicos en los casos de estadios predemenciales de EA con afectación cognitiva moderada (Davis et al. 1999; Mufson et al. 1997; revisado en Mesulam 2004). Además, la interferencia farmacológica colinérgica o la lesión experimental de las estructuras colinérgicas del prosencéfalo basal, producen una alteración en memoria y aprendizaje, que puede revertirse mediante agonistas colinérgicos (Lin et al. 1999; George et al. 2006). En la EA la pérdida progresiva de neuronas colinérgicas se refleja en la reducción de marcadores colinérgicos como la colinoacetiltransferasa (ChAT, enzima limitante de la síntesis de acetilcolina), la acetilcolinesterasa (AChE, enzima metabolizante) y los receptores colinérgicos muscarínicos y nicotínicos (Nordberg 1992; Bierer et al. 1995). Esta pérdida neuronal provoca una importante reducción de la inervación colinérgica a nivel cortical aunque ésta no es uniforme. Así, las áreas con mayor inervación colinérgica son las que sufren el principal deterioro, seguidas de áreas de asociación frontal o parietal, la ínsula y el lóbulo temporal, mientras que en las áreas primarias motoras, somatosensoriales y visuales, y el giro cingulado la afectación es menor.

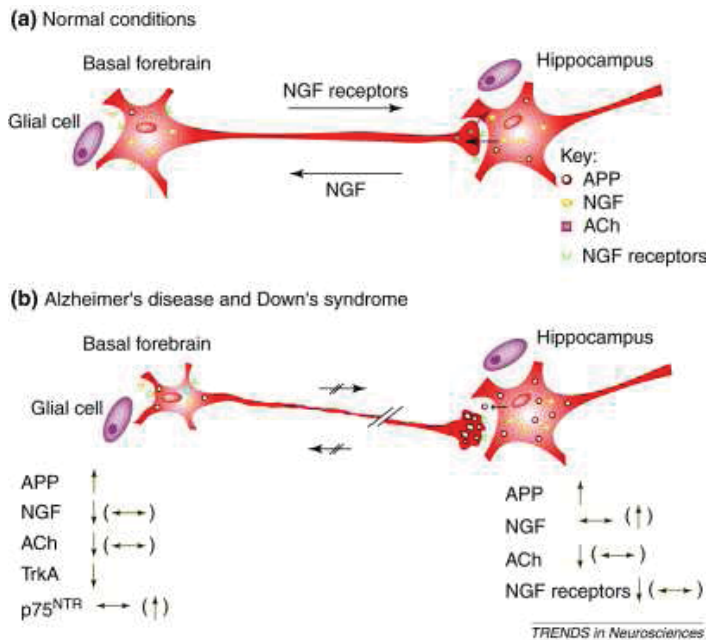
En los últimos años, diversos autores han establecido una estrecha relación entre la neurotransmisión colinérgica del prosencéfalo basal, los factores neurotróficos y el metabolismo de PPA en la patogénesis y evolución de la EA y SD (Lin et al. 1999;

Isacson y Lin 2000; Capsoni et al. 2000). La colocalización de acetilcolinesterasa (AChE) con los depósitos del péptido Ab en cerebros de pacientes con EA (Mesulam 1986; Moran et al. 1993), así como la capacidad de AChE de afectar el procesamiento de PPA (Mori et al. 1995; Lahiri et al. 1997; Racchi et al. 2001) y de favorecer la agregación de péptidos Ab con la posterior formación de las placas seniles (Inestrosa et al. 1996; Rees et al. 2005), sugieren una clara conexión entre el metabolismo de PPA y la neurotransmisión colinérgica (Zhang 2004). En este sentido se ha descrito que el péptido Ab provoca un incremento local de la concentración de AChE entorno a las placas amiloides (Fodero et al. 2004). Por otro lado, la estimulación farmacológica de los receptores de la acetilcolina muscarínicos (Nitsch et al. 1993; Muller et al. 1997; Hock et al. 2003; Canet-Aviles et al. 2002) y nicotínicos (Seo et al. 2001; Utsuki et al. 2002) provoca un incremento en la secreción y procesamiento de PPA por la vía de α -secretasa, con la consiguiente reducción en la producción del péptido Ab. Sin embargo, en función de las subunidades de los receptores muscarínicos también se puede incrementar la actividad de β -secretasas como BACE1 (Zuchner et al. 2004).

El efecto neurotóxico del péptido Ab sobre las neuronas colinérgicas estaría mediado a través de una vía excitotóxica (Harkany et al. 2002) y se ha descrito que disminuye la concentración de los receptores nicotínicos (Liu et al. 2001). Estas evidencias sugieren que los déficit colinérgicos observados en estadios tempranos de la EA pueden deberse al efecto tóxico del péptido Ab sobre este sistema, siendo un mecanismo independiente del que provocaría la muerte neuronal posterior (Blusztajn y Berse 2000).

Por otro lado, el correcto funcionamiento de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal depende del apropiado suplemento de NGF aportado por las regiones diana del sistema colinérgico. Así, la atrofia y pérdida neuronal colinérgica asociada a la edad tanto en cerebros normales como de EA, no se acompaña de reducción en los niveles de NGF en hipocampo y corteza cerebral, pero sí a nivel del prosencéfalo basal, región que alcanza a través de su transporte retrógrado (Allen et al. 1991; Scott et al. 1995; Hellweg et al. 1998) (Esquema 7). Este transporte retrogrado de NGF desde los terminales al núcleo celular se consigue mediante los receptores de NGF de alta afinidad (TrkA), mientras que los

receptores de baja afinidad (p75) son importantes para la captación de NGF por la membrana presináptica. Los cerebros de EA muestran una reducción en la expresión de los receptores TrkA y p75 a nivel del prosencéfalo basal (Mufson et al. 2002), si bien el nivel de expresión de los receptores p75 no varía con respecto a los cerebros sanos en las áreas terminales (Counts et al. 2004) (Esquema 7). Además de su implicación en la supervivencia de las neuronas colinérgicas, NGF se ha relacionado con el procesamiento del PPA ya que favorece su metabolización a través de la vía no amiloidogénica por activación de receptores TrkA (Villa et al. 2001), mientras que a través de receptores p75, NGF mediaría la regulación transcripcional de la expresión de PPA (Rossner et al. 1998). Finalmente, la acumulación extracelular de péptido Ab puede provocar la desestabilización de las membranas presinápticas que contienen los receptores de NGF resultando en una disrupción de la señalización a través de esta vía (revisado en Salehi et al. 2004). Por tanto, la atrofia y pérdida de neuronas colinérgicas podría ser debido tanto a alteraciones bien en el transporte retrogrado de NGF a lo largo de las neuronas colinérgicas como a su unión a los receptores TrkA o su liberación desde las áreas diana (Mufson et al. 1995; Sofroniew et al. 2001; Capsoni et al. 2000).



Esquema 7. Representación de las neuronas colinérgicas en un estado fisiológico normal y en pacientes con EA y SD. Obtenido de Isacson et al, 2002

3.5. El proceso neurodegenerativo en el síndrome de Down: Consecuencias a nivel cognitivo y la aparición de demencia

Es generalmente aceptado que los pacientes adultos con SD tienen un mayor riesgo de desarrollar demencia relacionada con EA respecto a la población general. Sin embargo, los signos neuropatológicos semejantes a la EA no siempre se correlacionan con la aparición de demencia clínica y al igual que sucede con los rasgos fenotípicos, existe una gran variabilidad interindividual en la edad de comienzo de la demencia en las personas con SD y en la evolución de ésta. Aún así, la edad de aparición es más temprana (World Health Organisation 1992), siendo la media de presentación los 56 años (Visser et al. 1997). Así, la prevalencia es del 9,4% en el rango de edad de 40-49 años, del 36,1% entre 50-59 años y del 54,5% para el intervalo de 60-69 años (Prasher 1995).

El mayor problema con que se enfrenta el clínico a la hora de determinar la aparición del deterioro cognitivo en pacientes con SD, es la presencia de un retraso mental previo que a su vez es muy variable. Para poder realizar un diagnóstico fiable es importante conocer el punto de partida intelectual y adaptativo del paciente, ya que pacientes con retraso mental moderado presentan menor riesgo de padecer demencia que los pacientes con retraso mental profundo o severo (Oliver et al. 1998). Por otra parte, el hecho de enfrentarnos con un deterioro intelectual que aparece en la edad adulta, obliga a descartar otros procesos frecuentes en el SD como el hipotiroidismo, el síndrome de la apnea del sueño, la depresión o la disminución de la capacidad auditiva o visual, ya que pueden provocar trastornos de la conducta que se asemejen a la demencia. Una vez descartada la comorbilidad con tales patologías, en los pacientes con SD se utilizan unas escalas de evaluación psicométrica que han sido progresivamente adaptadas y perfeccionadas para su aplicación en personas con deficiencia mental previa (Shultz et al. 2004; Ball et al. 2004; Prasher et al. 2004). Estas herramientas consideran que para el diagnóstico de demencia es preciso observar cambios importantes no solamente en la cognición, sino también en el humor, la conducta y el funcionamiento social, de acuerdo con los criterios diagnósticos de la DCR-10 (*Diagnostic Criteria for Research*) que se mantengan o agraven durante un mínimo de 2 años. Finalmente, es necesario también determinar la evolución temporal del declive de las funciones cognitivas. En este sentido, algunos síntomas, como el

deterioro del lenguaje o los trastornos de la marcha suelen marcar las fases iniciales del deterioro. Esta progresiva pérdida funcional puede ser utilizada como un índice de demencia en los pacientes con SD (Cooper y Prasher 1998; Aylward et al. 1997). Las áreas de afectación son:

- 1) *Memoria*. Problemas en la adquisición de nueva información: eventos sociales, ubicación de objetos colocados recientemente o tareas rutinarias.
- 2) *Otras funciones cognitivas*. Cambios o deterioros en la capacidad de juicio y el razonamiento, en los hábitos, en el aseo personal, etc.
- 3) *Orientación*. Pérdida progresiva de la orientación en tiempo y espacio.
- 4) *Control emocional, motivación, conducta social*. Cambios en el estado emocional, irritabilidad, apatía, retraimiento social, cambios de humor, reducción de la actividad en general, alucinaciones, aparición de conductas anómalas (agresividad, pérdida de atención).

Posteriormente se pueden producir trastornos funcionales progresivos con cambios de personalidad, periodos crecientes de apatía e inactividad, pérdida de las habilidades de adaptación cotidiana, de la memoria visual, reducción del lenguaje expresivo, confusión y desorientación, hiperreflexia y otros signos neurológicos como convulsiones, o estereotipias. Además y pese a que no existen signos neurofisiológicos que se hayan relacionado con el deterioro neurocognitivo algunos estudios demuestran que en el EEG de pacientes con SD y demencia aparece un enlentecimiento progresivo del ritmo occipital dominante que guarda relación con el declive cognitivo (Visser et al. 1996).

4. GENES CANDIDATOS IMPLICADOS EN LOS PROCESOS NEURODEGENERATIVOS PRESENTES EN EL SÍNDROME DE DOWN

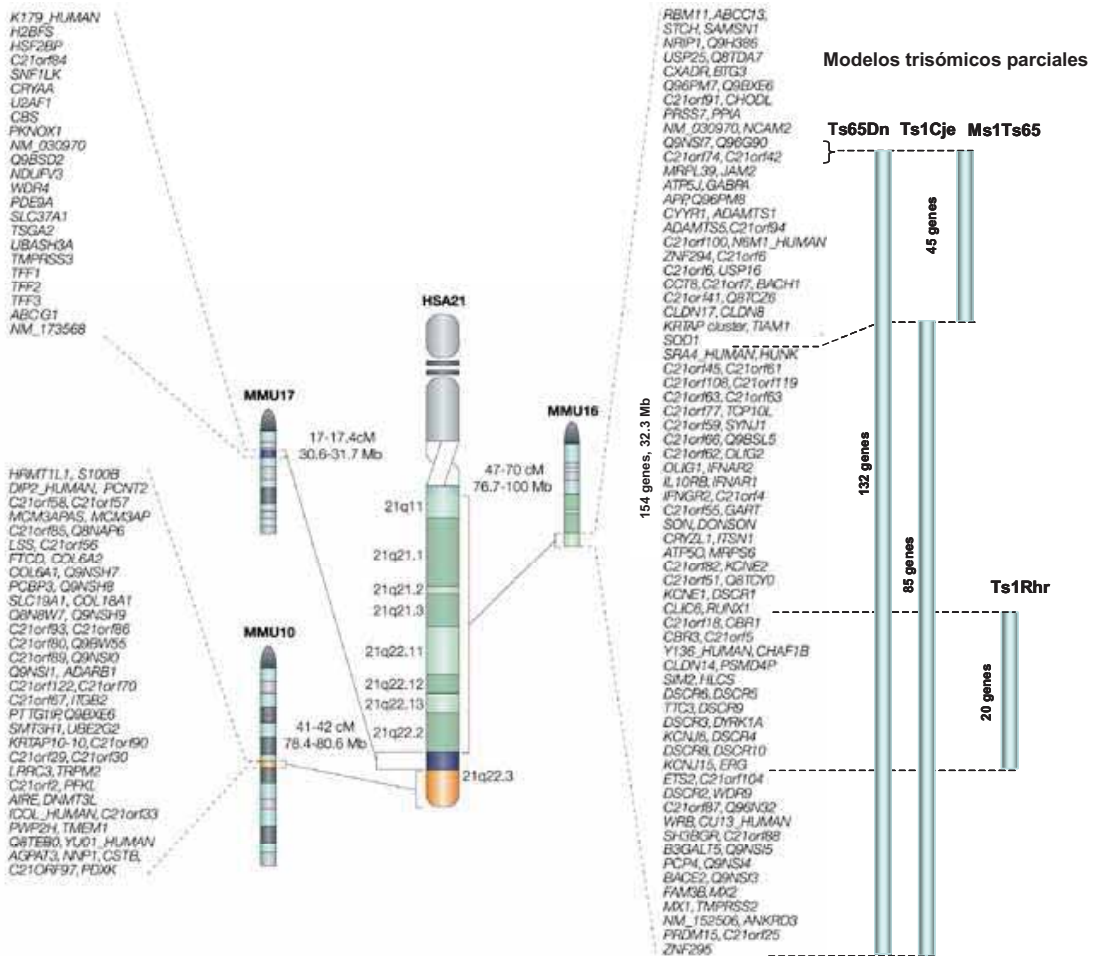
4.1. Generación de modelos murinos del cromosoma 21

La mayor parte de estos desbalances de dosis cromosómicas no son viables, pero en el caso del cromosoma 21 la viabilidad posiblemente reside en la poca densidad de regiones codificantes de este cromosoma, el menor del genoma humano. En efecto, el cromosoma 21 (HSA21) es el autosoma humano más pequeño, representando el 1-1.5% de la longitud total del genoma haploide. En el año 2000 fue publicada la secuencia genética completa del brazo largo de este cromosoma en la que inicialmente se estimó la presencia de 225 genes (Hattori et al. 2000), aunque el número total de genes no está todavía totalmente establecido.

La mayor parte de los casos de SD son debidos a la trisomía completa del HSA21 (Epstein 2002), siendo la tercera copia predominantemente de origen materno (Antonarakis et al. 1992; Sherman et al. 1994). Sin embargo, existen casos de SD originados por trisomías parciales del HSA21, bien debidas a una duplicación intersticial del cromosoma o a una translocación que afecte de manera exclusiva a este cromosoma. Dentro del HSA21 y a partir de estudios de correlación genotipo/fenotipo, se ha acotado una región cromosómica de 5.4 Mb que se extiende desde el marcador D21S17 hasta el gen MX1 y BCE1, considerada como la región mínima de este cromosoma que debe estar triplicada para observar el fenotipo propio del SD, la denominada “región crítica del síndrome de Down” (DSCR, Down Sndrome Critical Region) (Delabar et al. 1993; Korenberg et al. 1994; Rahmani et al. 1989). Sin embargo, existen casos de trisomías parciales diferentes de las que incluyen DSCR y que muestran el fenotipo de SD (Korenberg et al. 1994), y de hecho, modelos murinos que sobreexpresan la región ortóloga a DSCR no presentan todas las características típicas del SD (Olson et al. 2004b). Por ello, algunos autores han planteado una teoría alternativa al concepto de región crítica y postulan que el fenotipo observado es causado por la alteración de la homeostasis génica y no por la sobreexpresión de determinados genes (Shapiro 1999).

Así pues, se ha cuestionado la existencia de única región cromosómica responsable de la patología del SD, e incluso la hipótesis de dosis génica. Sin embargo, la identificación en los últimos años de genes dosis-sensibles, en los que pequeños cambios en los niveles de expresión pueden tener consecuencias fenotípicas importantes abre nuevas vías no solamente para comprender la patogenia de la enfermedad, sino también para la identificación de dianas moleculares que puedan tener un papel protector o quizá incluso revertir las alteraciones presentes en los pacientes con SD.

En este sentido, el empleo de modelos murinos genéticamente modificados ha demostrado ser una herramienta muy útil para esclarecer la influencia de la sobreexpresión de un gen o un conjunto de genes en un determinado fenotipo. A pesar de las diferencias filogenéticas que existen entre ratones y seres humanos, el genoma de ambos guarda una alta homología (Mural et al. 2002). En el ratón los genes ortólogos a los del cromosoma 21 humano se localizan en los cromosomas murinos 16, 17 y 10 (MMU16, MMU17, MMU10, respectivamente) (Esquema 8). El MMU16 contiene a su vez genes ortólogos de otros cromosomas humanos (cromosoma 3, 22, 8 y 16). Debido a la elevada sintenia entre el HSA21 y MMU16, se han generado diversos modelos de ratones trisómicos para el MMU16 como modelos del SD (Esquema 8). No obstante, es necesario destacar que ninguno de los modelos murinos existentes en la actualidad mimetiza perfectamente las alteraciones cromosómicas observadas en el SD, aunque el modelo Ts65Dn es posiblemente el que mejor remeda el fenotipo a nivel de sistema nervioso central.



Esquema 8. Representación de los genes presentes en cromosoma HSA21 ortólogos en los cromosomas murinos (MMU 16,17, 10) y de los modelos murinos trisómicos. (Adaptado de Antonarakis et al., 2004)

Siguiendo la hipótesis del SD de la dosis génica basada en que el fenotipo observado es consecuencia de la sobreexpresión de genes específicos, la generación de modelos murinos genéticamente modificados para estudiar la relación genotipo/fenotipo de los genes del HSA21 (Dierssen et al. 2001) es una técnica de fundamental importancia para conseguir la identificación de genes con relevancia patogenética y el esclarecimiento de las bases moleculares, bioquímicas y celulares del SD. En muchos casos, se trata de genes expresados en el sistema nervioso central, con funciones relevantes en la actividad de las neuronas, y que se expresan durante el desarrollo del tejido nervioso.

Las estrategias utilizadas para la generación de modelos de SD en el ratón han sido tres:

1. La generación de ratones con una copia extra, ya sea completa o parcial, del cromosoma 16 murino (MMU16) que comparte regiones de sintenia conservada con el HSA21. Estos modelos constituyen un modelo global de la enfermedad in vivo.
2. La introducción de fragmentos grandes de DNA (YACs o BACs) en el genoma del ratón.
3. La sobreexpresión de un único gen, o combinación de genes, de este cromosoma que permitirá diseccionar la participación de genes individuales en el fenotipo y realizar experimentos de terapia génica.

El análisis comparativo de los fenotipos observados entre los diferentes modelos permite una aproximación a los genes que pueden tener un papel más relevante en esta patología, con las limitaciones propias de estas metodologías (diferentes fondos genéticos, promotores heterólogos, modelos inducibles etc). Sin embargo extraer conclusiones excluyentes sobre la participación de determinados genes en el SD resulta muy arriesgado ya que la alteración del equilibrio génico que está teniendo lugar podría estar desencadenando procesos compensatorios que serían los principales efectores.

Entre los modelos de trisomía, el ratón **Ts16** presenta una triplicación de MMU16 (ortólogo a HSA21) constituyendo un modelo potencial de SD (Yokoi et al. 1986; Reeves et al. 1986). Los fetos trisómicos presentan alteraciones cardíacas y una importante afectación a nivel del sistema nervioso central caracterizado por hipoplasia cerebral, déficit en la neurogénesis, degeneración de neuronas colinérgicas hipocampales y alteración de la corticogénesis y la conectividad neuronal (revisado en Galdzicki et al. 2001). Desafortunadamente estos ratones no son viables, por lo que se han desarrollado diferentes estrategias para la obtención de ratones con trisomías parciales del MMU16.

Uno de los modelos trisómicos más estudiados es el ratón **Ts65Dn** que presenta triplicación de la región comprendida entre el gen *App* y *Znf295* (región sinténica al HSA21 y contiene la DSCR) (Davisson et al. 1990; 1993). Este ratón es viable, longevo y presenta muchos de los signos patológicos de SD entre los que destacan

las alteraciones craneofaciales (Richtsmeier et al. 2002) y neurales. Así, diversos autores han descrito disfunciones cognitivas en este modelo que presenta alteraciones en memoria espacial (Escorihuela et al. 1995; Demas et al. 1996; Reeves et al. 1995), memoria de trabajo (Hunter et al. 2003), memoria reciente (Coussons-Read y Crnic 1996; Holtzman et al. 1996) y discriminación de contexto (Hyde y Crnic 2001). Los déficits observados en aprendizaje y memoria, sugieren una disfunción a nivel hipocámpico y cortical. Efectivamente, en el hipocampo se han hallado numerosas alteraciones como disminución en la producción de AMPc (Dierssen et al. 1997), cambios en la expresión del receptor p75 (Cooper et al. 2001), alteraciones morfológicas en las espinas del giro dentado y CA1 (Belichenko et al. 2004), y interrupciones en LTP y LTD (Siarey et al. 1997; Costa y Grybko 2005). Además hay que resaltar, una reducción en las sinapsis excitatorias de la corteza temporal (Kurt et al. 2000) y la menor complejidad del árbol dendrítico de las neuronas piramidales de la corteza frontal (Dierssen et al. 2003), que comprometería el correcto funcionamiento de la circuiteria cerebral con importantes implicaciones conductuales. Por otro lado este modelo presenta alteraciones motoras relevantes caracterizadas por hiperactividad (Coussons-Read y Crnic 1996; Escorihuela et al. 1995), disfunción en la coordinación motora (Costa et al. 1999), en el patrón de la marcha (Hampton et al. 2004) y el equilibrio. Parte de estas alteraciones podrían estar relacionadas con la disfunción cerebelar debida a una reducción en el volumen cerebelar que se acompaña de una disminución en la densidad de las células granulares (Baxter et al. 2000).

El ratón Ts65Dn es también un buen modelo para el estudio de la evolución de EA ya que muestra varios de los rasgos característicos de la enfermedad como son la degeneración colinérgica del prosencéfalo basal asociada a la edad (Holtzman et al. 1996; Granholm et al. 2000) que se acompaña de un incremento compensatorio de la actividad colinoacetil transferasa en el hipocampo (Seo e Isacson 2005), y de un fallo en el transporte retrógrado de NGF (Cooper et al. 2001). La expresión de PPA se encuentra incrementada (Holtzman et al. 1996) y se detecta una mayor cantidad de péptido Ab con respecto a los animales diploides, aunque no derive en la formación de placas seniles en el cerebro de este ratón (Hunter et al. 2003; 2004). Además, el ratón Ts65Dn presenta alteraciones en la población glial caracterizada por hipertrofia y un incremento en el número de astrocitos (Holtzman et al. 1996),

similar a la observada en los cerebros de pacientes con SD (Griffin et al. 1989) (Esquema 9).

Rasgo	Síndrome de Down	Ratón Ts65Dn
Crecimiento y desarrollo	Crecimiento lento, talla baja y obesidad	Retraso en el crecimiento y aumento de peso
Dismorfogenia craneofacial	Si	Si
Anomalías hematológicas e inmunitarias	Si	Si
Esterilidad sexo masculino	Si	Si
Embarazo	Dificultades en la ovulación, vida reproductora más corta	Camadas pequeñas, vida reproductora más corta
Hiperactividad	En algunos	Si
Conductas estereotípicas	En algunos	Si
Reducción del volumen del cerebelo	Si	Si
Alteraciones de la marcha	Si	Si
Convulsiones	En algunos	En algunos
Dificultad para interrumpir conductas inapropiadas	En algunos	Si
Respuesta al dolor	Alterada	Alterada
Déficit de aprendizaje y memoria que posiblemente implique disfunción de hipocampo	Si	Si
Reducción en la respuesta de las vías de señalización intraneuronal	Si	Si
Reducción de receptores TrkA conforme la edad avanza	Si	Si
Reducción del volumen del hipocampo	Si	Si
Reducción de espinas dendríticas en células piramidales de la corteza cerebral	Si	Si
Degeneración de neuronas colinérgicas en el telencéfalo basal	Si	Si
Envejecimiento	Esperanza de vida más corta	Esperanza de vida más corta
El aprendizaje y la memoria demuestran declive con la edad	Si	Si
Estrés oxidativo	Si	Probable

Esquema 9. Similitudes fenotípicas entre el SD y el ratón Ts65Dn. Adaptado de Patterson y Costa, 2005.

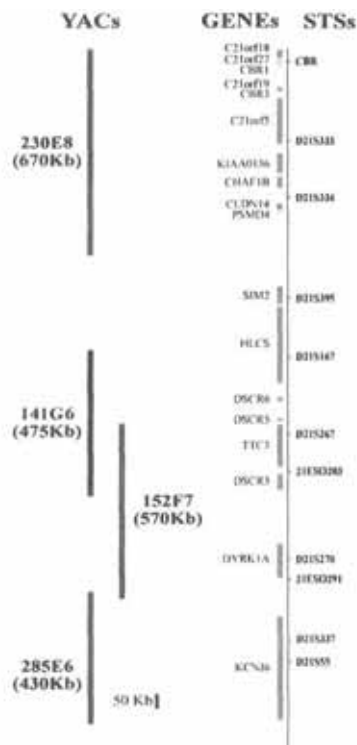
Recientemente se han generado otros modelos con trisomía parcial en la búsqueda de acotar regiones cromosómicas cuya triplicación fuera suficiente para producir los rasgos fenotípicos propios del SD. El ratón **Ts1Cje** posee un segmento cromosómico extra más corto que el ratón Ts65Dn, extendiéndose desde el gen *Sod1* hasta *Znf295*, pero no incluye *Sod1* funcional (Sago et al. 1998). Este modelo, al igual que el ratón Ts65Dn, muestra alteraciones en aprendizaje y memoria pero menos severas, como se demuestra en la sesión de cambio de posición de la plataforma (Sago et al. 1998; 2000) y se caracteriza por presentar hipoactividad leve. En este modelo no se ha detectado degeneración colinérgica a nivel del prosencéfalo basal.

El ratón **Ms1Ts65** cuyo segmento extra abarca la región comprendida entre *Sod1* y *App* y que se obtuvo a partir de los cruces entre Ts65Dn y Ts1Cje permite determinar la contribución de la región sobreexpresada en Ts65Dn pero no presente en el ratón Ts1Cje. Este modelo presenta una actividad espontánea normal y alteraciones más sutiles en memoria y aprendizaje que los otros modelos trisómicos (Sago et al. 2000).

El modelo trisómico de más reciente creación es el **Ts1Rhr**, que triplica sólo el 32% de los genes del ratón TS65Dn y contiene únicamente el segmento ortólogo a DSCR. Con este modelo, los investigadores pretendían remedar de forma mucho más certera los rasgos fenotípicos de esa región mínima que debería dar lugar a la mayor parte de los signos de SD. Sin embargo, este ratón no presenta las alteraciones craneofaciales observadas en el resto de los modelos trisómicos (Olson et al. 2004a) que se corresponden con las descritas en los pacientes con SD (Delabar et al. 1993; Korenberg et al. 1994). A falta de una caracterización fenotípica más profunda de este modelo, por ahora solamente se puede afirmar que la sobreexpresión única de los genes de DSCR no es suficiente para producir la dismorfología facial asociada al SD, al menos en el ratón. Si bien es prematuro adelantar conclusiones, ya que es necesario comprobar si los genes triplicados están realmente sobreexpresados en este modelo, estos datos podrían hacernos revisar los conceptos que hasta ahora se han tomado como establecidos, como la extensión de la región mínima o incluso su propia existencia. Es necesario sin embargo ser cauteloso, ya que se trata de un concepto importante que ha determinado durante años las líneas fundamentales de orientación de la investigación en SD.

Debido a que las regiones triplicadas en los modelos mencionados hasta aquí involucran un gran número de genes, lo cuál nos proporciona un modelo del SD, pero no permite determinar la contribución de genes específicos a fenotipos concretos, se han generado una serie de modelos que triplican regiones cromosómicas más cortas. Ello permite limitar y acotar el número de genes candidatos en trisomía, y por tanto facilita la identificación de posibles dianas moleculares con fines terapéuticos.

Una de las estrategias que en su momento tuvo un gran impacto por su originalidad fue la generación de lo que sus autores denominaron “librerías in vivo”. A partir de una región de 2Mb incluida en la DSCR, se crearon cromosomas artificiales de levaduras (YAC, Yeast Artificial Chromosome), para originar toda una batería de líneas de **ratones transgénicos construídos mediante YACs**, que presentaban en triplicado diferentes fragmentos genómicos bien contiguos o bien parcialmente solapados con los otros (Smith et al. 1995; 1997) (Esquema 10).



Esquema 10. Representación de la DSCR destallando los 4 YACs empleados para la generación de los modelos murinos transgénicos. Obtenido de Branchi et al, 2004.

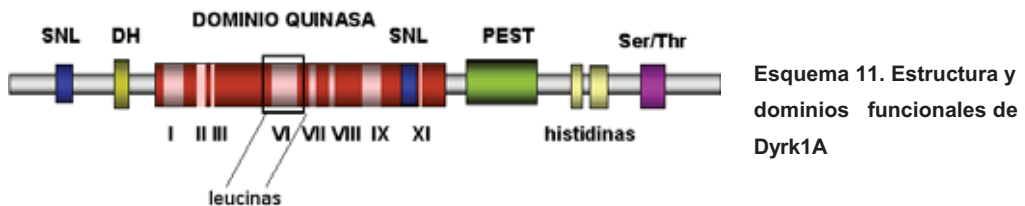
De estas líneas, por diferentes razones generalmente metodológicas únicamente se estudiaron cuatro (285E6, 141G6, 230E8 y 152F7). El estudio comparativo de los cuatro modelos mostró que únicamente el ratón YAC152F7 presentaba alteraciones en aprendizaje y memoria e hiperactividad durante el desarrollo, además de un incremento en el volumen cerebral y en el tamaño neuronal (Branchi et al. 2004), si bien se observaban asimismo variaciones fenotípicas en celularidad en el YAC230E8. El único gen que es exclusivo del fragmento cromosómico 152F7 sin aparecer compartido en otros YACs es DYRK1A, (ver más abajo). Por tanto, ya en estos primeros trabajos se identificaba este gen como un buen candidato para explicar las alteraciones observadas.

Además de este modelo, se han generado otros que sobreexpresan Dyrk1A bajo un promotor heterólogo, como el que se estudia en el contexto de este proyecto de Tesis Doctoral y recientemente, utilizando un cromosoma de bacteria que incorpora únicamente el gen DYRK1A humano completo con su promotor homólogo, se ha generado un ratón transgénico constituído mediante BAC que sobreexpresa Dyrk1A y presenta alteraciones cognitivas acompañadas de modificaciones en LTP y LTD (Ahn et al. 2006).

4.2. Dyrk1A como gen candidato para el síndrome de Down y enfermedad de Alzheimer

En los últimos años, numerosas evidencias experimentales han permitido proponer que DYRK1A es un gen que podría jugar un papel importante en el SD, tanto durante la gestación como en la vida adulta actuando sobre diferentes aspectos estructurales y funcionales del SNC.

DYRK1A (Dual specificity Yak1- Related Kinase) es un gen de copia única que se localiza entre las regiones 21q22.13 y 21q22.2 del HSA21 enmarcado dentro de la DSCR (Hattori et al. 2000). Clonado en 1996 por diversos grupos de investigación (Guimera et al. 1996; Shindoh et al. 1996; Song et al. 1996), DYRK1A se extiende a lo largo de 150 kb y está constituido por al menos 14 exones, 11 de los cuales son codificantes (Wang et al. 1998; Guimera et al. 1999). Da lugar a 2 isoformas proteicas de 763 y 754 aminoácidos, ésta última como resultado del procesamiento alternativo del exón 6 (Kentrup et al. 1996; Guimera et al. 1999).



DYRK1A codifica para una serin/treonin quinasa de actividad dual de 90 kDa (Kentrup et al. 1996), que fosforila sustratos exógenos en residuos serina/treonina y se autofosforila en residuos tirosina (Becker y Joost 1999; Kentrup et al. 1996; Wiechmann et al. 2003; Lochhead et al. 2005). El dominio catalítico está constituido por 11 subdominios (I-XI) que incluyen un motivo de cuatro leucinas que podría formar una estructura de cremallera de leucinas, generalmente implicada en interacciones proteína-proteína o proteína-DNA. Junto al dominio catalítico existe una secuencia altamente conservada en todas las quinastas de la familia DYRK particularmente rica en residuos ácidos (DH box) que junto al dominio catalítico podría ser responsable de la estructura terciaria de la proteína (Becker y Joost 1999; Himpel et al. 2001). DYRK1A presenta a su vez dos señales de localización nuclear (SLN), una en el extremo amino terminal (Becker et al. 1998) y otra entre

los dominios catalíticos X-XI (Alvarez et al. 2003) rica en histidinas responsables de su localización subcelular a nivel del núcleo. En la región carboxi-terminal del dominio catalítico se localiza un dominio PEST rico en serinas y treoninas, posiblemente implicado en la degradación de las proteínas. Las secuencias del dominio catalítico y DH-box se encuentran altamente conservadas en los genes ortólogos de DYRK1A de diferentes especies invertebradas (Mnb en *D. melanogaster*; Yak1p, en *S. cerevisiae*; Pomp1 en *S. pombe*, mbk-1 en *C. elegans*), sugiriendo que esta quinasa realiza una función evolutivamente conservada en la regulación celular (Esquema 11).

La localización nuclear de DYRK1A ha sido demostrada por varios grupos de investigación (Hammerle et al. 2003; Marti et al. 2003; Alvarez et al. 2003), como lo ha sido su capacidad de participar en la regulación de la actividad de diferentes factores de transcripción como STAT3, Gli-1, FORKHEAD, eIF2B ϵ , CREB, 14-3-3, NFAT a través de su fosforilación (Matsuo et al. 2001; Yang et al. 2001; Kim et al. 2004); (Woods et al. 2001a; 2001b; Mao et al. 2002; Arron et al. 2006). El patrón de localización subcelular de DYRK1A con la posibilidad de translocar a núcleo y la variedad de sustratos tanto citoplasmáticos como nucleares de esta quinasa, sugieren la participación de DYRK1A en una gran variedad de funciones fisiológicas y, por tanto, posiblemente en diferentes procesos patológicos (ver Esquema 12)

Antes de iniciar el recorrido por los diferentes hallazgos relativos a DYRK1A es necesario considerar para su correcta interpretación los siguientes hechos:

1. La mayor parte de los sustratos de fosforilación se han identificado *in vitro* y para muchos de ellos aún no hay constancia *in vivo*.
2. DYRK1A participa en el neurodesarrollo, por lo que los efectos de su desregulación en el adulto pueden ser consecuencia de alteraciones del neurodesarrollo no compensadas.
3. Su localización subcelular puede variar posiblemente con consecuencias funcionales lo que dota de una gran flexibilidad funcional a este gen

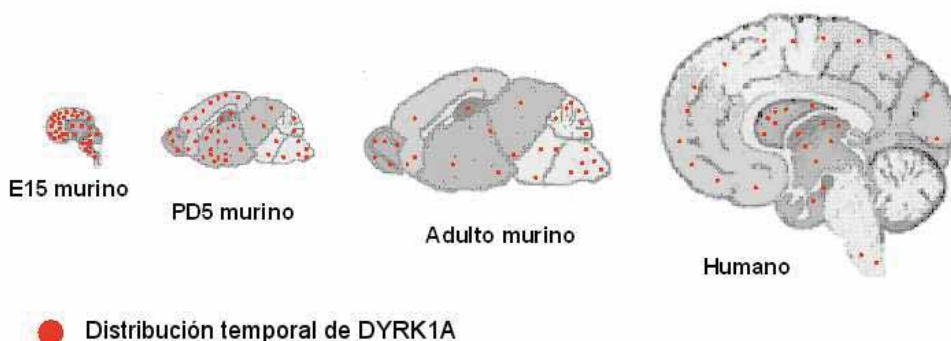
En concreto DYRK1A se ha implicado en SD debido a su localización en DSCR, su patrón de expresión en tejidos fetales y adultos (Guimera et al. 1996; 1999; Shindoh et al. 1996; Song et al. 1996) y su sobreexpresión en el cerebro de SD y del ratón Ts65Dn (Guimera et al. 1999). Datos experimentales que se refieren más abajo han sugerido que es un gen dosis sensible, por lo que su sobreexpresión podría conducir a un importante desajuste de diversos procesos celulares.

SUSTRATO	LOCALIZACION SUBCELULAR	FUNCION	REFERENCIA
14-3-3	nuclear/ citosólica	Regulación del andamiaje, protección de proteólisis, defosforilación, y secuestro de proteínas diana	Kim et al. (2004)
Androgen receptor-interacting protein 4 (Arip4)	nuclear	Regulación de la transcripción inducida por hormonas esteroideas	Sitz et al. (2004)
cAMP responsive element binding protein (CREB)	nuclear	Desarrollo y diferenciación neuronal. Plasticidad sináptica. Procesos de aprendizaje y memoria	Yang et al. (2001)
Chromatin remodelling factor SNR1	nuclear	Remodelación de la cromatina	Kinstrie et al. (2006)
Cyclin L2	nuclear	Regulación transcripcional relacionado con splicing de pre-mRNA	De Graaf et al. (2004)
Dynamin	citosólica	Reciclaje de vesículas sinápticas endocíticas	Cheng-Hwang et al. (2002) Huang et al. (2004)
Eukaryotic initiation factor 2Bepsilon (eIF2Bε)	citosólica	Regulación del inicio de la traducción de mRNA	Woods et al. (2001 a)
Forkhead (FKHR)	nuclear	Control de la expresión génica por insulina y regulación de la apoptosis por factores de supervivencia	Woods et al (2001b) Van Groote et al. (2003)
Glioma-associated oncogene (GLI1)	nuclear	Regulación transcripcional	Mao et al. (2002)
Glycogen synthase	citosólica	Regulación del metabolismo de glucosa	Skurat & Dietrich (2004)
Huntingtin interacting protein-1 (Hip-1)	citosólica	Posible papel en endocitosis y el mantenimiento del citoesqueleto de actina	Kang et al. (2005)
Nuclear factor of activated T cells (NFAT)	nuclear/ citosólica	Regulación del desarrollo y diferenciación celular	Gwack et al. (2006)
Phytanoyl-CoA α-hydroxylase associated protein 1 (PAHX-AP1)	citosólica	Desconocida, posiblemente relacionada con la enfermedad de Refsum	Bescond & Rahmani (2005)
Ras/MAP kinase pathway	nuclear/ citosólica	Crecimiento, diferenciación y transformación celular	Kelly & Rahmani (2005)
SF3b1	nuclear	Regulación de pre mRNA-splicing	de Graaf et al. (2006)
Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)	nuclear	Activación de transcripción	Matsuo et al. (2001)
tau	citosólica	Regulación de la dinámica de microtúbulos. Hiperfosforilada en enfermedad de Alzheimer	Woods et al. (2001 a)

Esquema 12. Sustratos de fosforilación de Dyrk1A

4.2.1. Patrón de expresión de Dyrk1A en SNC

En ratón se ha detectado un patrón específico de expresión de Dyrk1A en diversas regiones del cerebro mediante hibridación in situ. En estadios embrionarios, *Dyrk1A* se expresa de forma ubicua, aunque con mayor intensidad en retina, bulbo olfatorio y médula espinal, mientras que en el cerebro adulto aparece en corteza cerebral, cerebelo, en neuronas piramidales del hipocampo y diversos núcleos hipotalámicos (Song et al. 1996; Guimera et al. 1996; Rahmani et al. 1998) estructuras severamente afectadas en el SD (Esquema 13). De manera similar, la expresión proteica de Dyrk1A en ratón se localiza principalmente en bulbo olfatorio, cerebelo, núcleos motores profundos y cerebelo (Marti et al. 2003).



Esquema 13. Expresión espacio-temporal de Dyrk1A en el cerebro

El estudio de expresión de la proteína revela una elevada expresión durante los estadios embrionarios que disminuye gradualmente en etapas postnatales (Okui et al. 1999), indicando una regulación diferencial entre la transcripción del RNAm y el recambio proteico. Este patrón de expresión tan intenso durante el desarrollo, sugiere un papel relevante en la neurogénesis y la diferenciación neuronal.

En el cerebro humano adulto, DYRK1A se expresa en regiones afectadas en SD como las capas superficiales de la neocorteza, en hipocampo principalmente en CA1, en núcleo caudado y tálamo. El patrón de expresión de DYRK1A en cerebro humano es ligeramente diferente al detectado en cerebro de ratón adulto y no sólo varía entre las diversas regiones del cerebro sino también entre diferentes tipos neuronales dentro de una misma estructura cerebral. A modo de ejemplo, en el cerebelo humano no se observa marcaje frente a esta proteína (Wegiel et al. 2004),

mientras que en ratón existe una expresión intensa en la corteza cerebelosa (Marti et al. 2003).

Este patrón temporal de expresión más intenso y generalizado durante el desarrollo y más específico y restringido en el adulto sugiere funciones diferenciales para este gen a lo largo de la vida del animal. Ello tiene claras implicaciones en la interpretación de las alteraciones observadas en el adulto que pueden ser específicas o derivadas de la alteración pre- o postnatal.

4.2.2. Papel de Dyrk1A en el neurodesarrollo

Además de su elevada expresión durante el periodo embrionario, otros datos experimentales sugieren la implicación de Dyrk1A en el desarrollo del SNC. Así, tanto la *Drosophila* mutante con pérdida de función de *mnb* (Tejedor et al. 1995) como el modelo murino con haploinsuficiencia de Dyrk1A (Dyrk1A^{+/-}) (Fotaki et al. 2002) presentan una reducción del tamaño cerebral, con mayor afectación de ciertas áreas. De igual forma, en modelos murinos que sobreexpresan Dyrk1A se han detectado cambios de tamaño cerebral si bien éstos son dispares. Así, el ratón Ts65Dn presenta una reducción, mientras que el ratón YAC527Fe muestra un incremento comparado con sus respectivos controles. Estos cambios en el volumen cerebral parecen ser debidos a cambios en el número de células generadas durante el proceso proliferativo del desarrollo postembrionario, involucrando a DYRK1A en la neurogenesis. De hecho, Dyrk1A se expresa transitoriamente en células neurales progenitoras durante la transición desde las divisiones proliferantes hacia las neurogénicas (Hammerle et al. 2002). Por otro lado, existe una onda de expresión de la proteína Dyrk1A durante la embriogénesis tardía, concretamente en poblaciones neuronales que inician la diferenciación (Hammerle et al. 2003). En ese momento se produce un incremento de su expresión a nivel nuclear que posteriormente se desplaza al cono de crecimiento dendrítico donde co-localiza con dinamina, una molécula implicada en el reciclaje de vesículas sinápticas y la internalización del receptor, para la que se ha descrito una participación en el crecimiento neurítico tanto en *Drosophila* (Kim y Wu 1987) como en vertebrados. Estos efectos sobre proliferación, que pueden derivar en cambios sustanciales en el tamaño del cerebro, podrían estar directamente relacionados con la reducción del tamaño del cerebro de pacientes con SD que se ha sugerido que podría ser

consecuencia de una hipocelularidad (Becker et al. 1991; Coyle et al. 1986). Recientemente, se ha involucrado a DYRK1A en las señales de transducción dependientes de Ras necesarias para la promoción y mantenimiento de la diferenciación neuronal (Kelly y Rahmani 2005). Por ello, la sobreexpresión de *DYRK1A* podría interferir en la diferenciación dendrítica provocando cambios importantes durante el desarrollo, perdurables en la etapa adulta con un importante impacto sobre la conectividad, que dificultaría el procesamiento correcto de la información y contribuiría de este modo a la patología dendrítica presente en el SD.

4.2.3. Papel de Dyrk1A en procesos cognitivos

Los cambios acontecidos durante el desarrollo determinarán el funcionamiento del SNC durante la etapa adulta y por tanto los efectos de la disregulación de Dyrk1A durante etapas embrionarias y fetales condicionarán la eficiencia de los sistemas neurales a largo plazo. Sin embargo, también se observa expresión de DYRK1A en el adulto en regiones cerebrales implicadas en funciones cognitivas por lo que no se puede descartar la implicación de esta proteína en aspectos funcionales específicos del adulto y no solamente derivados de las alteraciones del neurodesarrollo. El estudio comparativo de expresión de DYRK1A en humanos utilizando tejidos procedentes de niños y adultos (Wegiel et al. 2004), indicó que la maduración del cerebro humano aparece asociado a un incremento en el número de neuronas DYRK1A positivas y a la acumulación de esta proteína en el soma neuronal, dendritas y sinapsis (Wegiel et al. 2004). Añadiendo a su localización en la sinapsis el hecho de que Dyrk1A fosforila dinamina (Chen-Hwang et al. 2002), no se puede descartar su posible papel en el ensamblaje del aparato endocítico, implicando esta proteína en la regulación de la transmisión sináptica y los cambios en su eficacia subyacentes a los procesos de memoria y aprendizaje. Asimismo, Dyrk1A es capaz de fosforilar factores de transcripción asociados a procesos cognitivos como CREB (Yang et al. 2001) o NFAT (Arron et al. 2006). Finalmente, el hecho de que los diversos modelos murinos con cambio de dosis de Dyrk1A presenten alteraciones cognitivas relevantes y que en humanos, DYRK1A se sobreexpresa en algunas estructuras afectadas en SD asociadas al retraso mental, como la neocorteza y el hipocampo, refuerzan la hipótesis de la participación de Dyrk1A en la regulación de los procesos cognitivos.

4.2.4. Papel de Dyrk1A en la función motora

La expresión de Dyrk1A en ratón en áreas relacionadas con el control motor como el cerebelo, la médula espinal y núcleos motores relacionados (Marti et al. 2003) apuntan a una posible implicación de este gen en estas funciones. Tanto el ratón Ts65Dn como los modelos murinos de sobreexpresión de Dyrk1A (TgDyrk1A y YAC527Fe) muestran hiperactividad, alteraciones motoras moderadas y retraso en el desarrollo neuromotor (Altafaj et al. 2001; Costa et al. 1999; Hyde et al. 2001; Branchi et al. 2004), mientras que el modelo murino con haploinsuficiencia de Dyrk1A muestra hipoactividad (Fotaki et al. 2002). De manera similar, en *Drosophila* mutante con reducción de dosis de *mnb* se han detectado alteraciones en actividad locomotora (Tejedor et al. 1995). Estas observaciones involucran a DYRK1A en un posible desarrollo aberrante del cerebro con consecuencias en la adquisición de las habilidades motoras pero posiblemente también en la propia funcionalidad de los sistemas motores en el adulto. Por tanto no se puede descartar que su sobreexpresión en SD tuviera consecuencias en la disfunción motora presente en estos pacientes.

4.2.5. Papel de Dyrk1A en procesos neurodegenerativos

En la actualidad, no está bien establecido el papel de DYRK1A en neurodegeneración, pero existen indicios que sugieren su participación en este proceso. Por un lado, DYRK1A mantiene su expresión en el cerebro de personas mayores de 60 años, aunque se observa una disminución de al menos un 15% de las neuronas Dyrk1A positivas en CA1 y corteza cerebral (Wegiel et al. 2004). Además se ha detectado una intensa expresión de la proteína en los cuerpos amiláceos de origen intracelular que se consideran como una respuesta neuronal frente al daño en el envejecimiento y procesos de neurodegeneración (Mrak et al. 1997; Singhrao et al. 1993). Con la edad se observa a su vez un incremento generalizado en el número de astrocitos marcados frente a DYRK1A (Wegiel et al. 2004), lo que no permite descartar la posible implicación de DYRK1A en la astrogliosis observada en el SD. Por otro lado, ensayos *in vitro* han demostrado que DYRK1A es capaz de fosforilar la proteína asociada a microtúbulos Tau en Thr²¹², un residuo fosforilado en Tau fetal e hiperfosforilado en EA y otras taupatías, que permite su reconocimiento y fosforilación por la quinasa GSK3 (Woods et al. 2001a). La posibilidad de que DYRK1A pueda actuar sobre Tau *in vivo* implicaría

que su sobreexpresión podría facilitar la hiperfosforilación de Tau causante de la formación de los ovillos neurofibrilares característicos de la EA y presentes en SD. Por otro lado, al igual que ocurre en la EA, el ratón Ts65Dn que contiene triplicado el gen *Dyrk1A*, presenta alteraciones en aprendizaje y memoria asociadas a la degeneración colinérgica. Estos datos sugieren que la sobreexpresión de *DYRK1A* en los pacientes con SD podría estar interviniendo en el envejecimiento prematuro y la instauración temprana de patología similar a la EA, por lo que resulta necesario e interesante realizar nuevas aproximaciones que esclarezcan esta hipótesis.

4.2.6. Consecuencias de la manipulación in vivo del gen *Dyrk1A*

a) Por pérdida de función

La anulación completa del gen *Dyrk1A* resulta letal para el ratón (Fotaki et al. 2002) pero la inactivación de sólo un alelo (ratón heterocigoto *Dyrk1A*+/-) permite la supervivencia del ratón aunque su viabilidad perinatal está comprometida en cierta medida y presenta un retraso general del desarrollo. El cerebro del ratón *Dyrk1A*+/- es significativamente más pequeño que el de sus hermanos de camada control, existiendo una reducción desproporcionada en bulbo olfatorio, mesencéfalo y metencéfalo ventral, si bien la citoarquitectura está conservada en la mayor parte de las regiones cerebrales (Fotaki et al. 2002).

Las alteraciones afectan también al tamaño del neuropilo y al aparato dendrítico, como se deduce de las alteraciones observadas en el fenotipo de las células piramidales de la corteza cerebral de estos ratones. Los ratones con reducción de función de *Dyrk1A* muestran un menor tamaño del árbol dendrítico con disminución muy significativa en el número de sus espinas (Benavides-Piccione et al. 2005), lo que indica que es necesaria la dosis suficiente de *Dyrk1A* para la correcta maduración neuronal, y que reducciones no muy importantes no pueden ser compensadas.

b) Por exceso: ratones transgénicos

En muchos casos, pequeños incrementos de dosis de genes únicos prácticamente no producen fenotipo. Sin embargo, los ratones *TgDyrk1A* presentan un retraso significativo en el desarrollo neuromotor, alteraciones del aprendizaje y un patrón locomotor hiperactivo en el adulto (Altafaj et al. 2001). Ello estaría en concordancia con el patrón de expresión del gen, que es ubicuo durante el neurodesarrollo, y en

el adulto se concentra en regiones motoras, olfatorias y en algunas estructuras cerebrales relacionadas con procesos de memoria y aprendizaje. En tareas de aprendizaje, los ratones TgDyrk1A muestran alteraciones en el aprendizaje visuo-espacial y en la flexibilidad cognitiva, lo que sugiere que hay alteraciones subyacentes en hipocampo y en corteza cerebral. Si bien más leves, cualitativamente estas alteraciones muestran una similitud clara con las observadas en el modelo Ts65Dn (ver más arriba), y si bien es evidente que Dyrk1A no es el único gen implicado en el defecto de memoria, estos hallazgos apuntan a que podría ser uno de los genes candidatos importantes. Por otro lado, ratones transgénicos de una librería in vivo de YACs (ver arriba) que contiene Dyrk1A (YAC152F7) también muestra alteraciones en aprendizaje e hiperactividad, si bien en este caso la sobreexpresión de Dyrk1A, junto con una triada de genes de la región crítica de SD da lugar a un incremento en el tamaño neuronal. Por otra parte, la sobreexpresión de DYRK1A se asocia en este modelo con un incremento en la fosforilación de una proteína de ciclo celular, ciclina B1 (Branchi et al. 2004). Finalmente, recientemente se ha generado un ratón transgénico con un BAC que contiene una única copia de *Dyrk1A* simulando así la dosis de este gen presente en SD. Estos ratones nuevamente presentan alteraciones en la plasticidad sináptica asociadas a cambios en memoria visuo-espacial.

En definitiva, el gen Dyrk1A a través de la proteína que codifica parece desempeñar una función relevante durante el desarrollo neuronal, tanto en procesos de proliferación como de diferenciación, con consecuencias posiblemente sobre procesos cognitivos y conductuales, pero también en procesos neurodegenerativos. Quedan por identificar las rutas bioquímicas implicadas en los efectos de Dyrk1A, y es necesario ser cautos ante las posibles implicaciones futuras de estos hallazgos, pese a la clara relación encontrada entre el exceso de copias de este gen y las disfunciones que ocasiona. Sin duda, entre los genes importantes para explicar el retraso mental del SD habrá otros genes clave. La identificación de estos genes representa tan sólo un primer paso en el desarrollo de tratamientos que puedan ser efectivos.

5. NEUROPLASTICIDAD IN VIVO EN EL SÍNDROME DE DOWN

Una de las características fundamentales de las primeras etapas de la vida del niño es la plasticidad del sistema nervioso sobre la cual se puede influir logrando un correcto desarrollo biológico cerebral que será la base estructural y el fundamento del desarrollo de esa persona. Los programas de intervención temprana se realizan durante los primeros años de vida del niño con SD para que adquiera las progresivas etapas de su desarrollo de la forma más adecuada y correcta, con el menor retraso posible respecto a los niños sin discapacidad (Connolly et al. 1993; Guralnick 1998). Al mismo tiempo el niño debe estar inmerso en un ambiente familiar afectivo, enriquecedor y estimulante, que resulta imprescindible y fundamental para lograr el máximo desarrollo de las capacidades del niño. Los beneficios de estos programas en el SD se han observado especialmente en la habilidad motora fina y en la actitud social, siendo más dudosas las mejoras en cuanto al control motor y los aspectos cognitivos y académicos.

El cerebro es un órgano caracterizado por su plasticidad, lo que supone que puede cambiar en función de las señales del entorno, lo que proporciona una enorme capacidad de adaptación. La psicología del desarrollo ha forjado expresiones como primer aprendizaje o primera experiencia debido a que la manera de aprender es totalmente diferente desde un punto de vista cualitativo en los primeros años de vida que en etapas posteriores. El denominado enriquecimiento ambiental proviene de una adaptación de los trabajos de investigación de Hebb (Hebb 1949) referidos a las condiciones ambientales que, comparadas con las condiciones de estabulación estándar, permiten una mejora de las posibilidades de estimulación y/o interacción física y social. El modelo consiste en estabular un grupo grande de animales (7-8) en jaulas amplias favoreciéndose así las oportunidades de interacción social, en las que además se introducen objetos (cajas, ruedas, túneles, casas, juguetes, tubos...) que se van intercambiando periódicamente, lo cual permite la interacción con estímulos no sociales. Estas condiciones de estabulación enriquecidas son suficientes para inducir modificaciones neuronales y conductuales (Mohammed et al. 2002; Wolfer et al. 2004).

Uno de los cambios más espectaculares asociado al enriquecimiento es el incremento de peso total del cerebro (Wainwright et al. 1993) y del grosor de la corteza cerebral (Uylings et al. 1978), fundamentalmente la corteza visual, somatosensorial y frontal posterior. Otras estructuras subcorticales con menor capacidad plástica que la corteza también experimentan un incremento de tamaño, como es el caso del tubérculo cuadragémimo superior, el estriado y el cerebelo (Greenough y Volkmar 1973). La exposición a enriquecimiento ambiental influye en el número de células observándose un aumento en el número de neuronas en giro dentado (Kempermann et al. 1997), si bien el efecto parece ser sobre la supervivencia neuronal, mientras que el simple ejercicio físico produce un efecto proliferativo (van Praag et al. 1999), por lo que el efecto combinado de ambas actividades podría producir cambios morfológicos más destacados. Además, se observa un incremento de la gliogénesis (Sirevaag et al. 1991) sugiriendo un mayor nivel de actividad cerebral ya que las células gliales, entre otras funciones, favorecen el aporte metabólico para la actividad neuronal.

Aparte de cambios en la densidad celular, el enriquecimiento modula a su vez la citoarquitectura neuronal. Se ha descrito una elongación de las dendritas y un mayor número de ramificaciones dendríticas aumentando así la complejidad del árbol dendrítico (Fuchs et al. 1990; Kempermann et al. 1997, revisado en van Praag et al. 2000; Leggio et al. 2005). El enriquecimiento produce además, un aumento del número de espinas dendríticas, conllevando posiblemente un aumento de contactos sinápticos (Globus et al. 1973; Rampon et al. 2000). Estos cambios a nivel de la sinapsis incluyen modificaciones de proteínas sinápticas como sinaptofisina y PSD-95 en varias regiones del cerebro (Nithianantharajah et al. 2004), incrementos en la proporción de sinapsis por neurona, del área total de contacto sináptico y del tamaño sináptico medio (Uylings et al. 1978; van Praag et al. 2000).

Los cambios descritos a nivel de la sinapsis afectan a los sistemas de neurotransmisión y consecuentemente a la transmisión de la información que se traduce a nivel fisiológico en modificaciones conductuales. El enriquecimiento ambiental incrementa los niveles de algunos neurotransmisores como la acetilcolina (Rosenzweig y Bennett 1972) y la expresión del gen para el receptor de serotonina

5-HT_{1A} (Rasmuson et al. 1998) y disminuye la actividad del transportador de dopamina en algunas regiones cerebrales (Zhu et al. 2005). Por otro lado, se ha descrito la activación de noradrenalina, serotonina y acetilcolina como consecuencia del ejercicio físico (Chaouloff 1989). Todos estos neurotransmisores participan en el aprendizaje y la plasticidad sináptica, así como en procesos de neurogénesis (Brezun y Daszuta 1999). Además, el enriquecimiento ambiental provoca cambios en el sistema glutamatérgico con consecuencias sobre LTP (Malenka y Nicoll 1999). De hecho el enriquecimiento produce cambios de expresión de moléculas en la cascada del receptor NMDA implicadas en la formación de LTP y LTD como son la calmodulina y la neurogranina (Rampon et al. 2000) y en la funcionalidad de los receptores NMDA (Bredy et al. 2004) y AMPA (Gagne et al. 1998; Naka et al. 2005).

5.1. Efectos conductuales del enriquecimiento ambiental

Durante años se ha demostrado que el enriquecimiento ambiental produce efectos positivos en aprendizaje y memoria, especialmente en tareas de memoria visuoespacial dependiente de hipocampo (Falkenberg et al. 1992; Paylor et al. 1992; Tees et al. 1990; Kempermann et al. 1998; Leggio et al. 2005) que se han correlacionado con un incremento de la neurogénesis en esta estructura (Bruehl-Jungerman et al. 2005). El efecto sobre la memoria reciente es menos claro, ya que mientras unos autores apuntan una mejoría tanto en la adquisición como en la retención, otros no hallan diferencias importantes (Ough et al. 1972).

Los efectos del enriquecimiento sobre la emotividad han sido menos descritos y resultan más cuestionables. Mientras algunos autores indican una falta de efecto (Fernandez-Teruel et al. 1997; Renner y Rosenzweig 1987), otros han descrito que los animales enriquecidos sufren una disminución de la reactividad emocional en pruebas clásicas como el laberinto elevado en cruz o el campo abierto (Chamove 1989; Escorihuela et al. 1994). Efectivamente, la cepa de ratones BALB/c descrita como patológicamente ansiosa (Griebel et al. 1993; Trullas y Skolnick 1993), disminuye su ansiedad tras enriquecimiento (Chapillon et al. 1999). Sin embargo, cuando a los animales se les somete a pruebas experimentales más agresivas como introducir un olor de un depredador en la jaula la ansiedad aumenta en los animales enriquecidos (Roy et al. 2001). En realidad, todas estas pruebas miden

distintos aspectos de las respuestas emocionales controladas por diferentes sustratos biológicos, por lo que el grado de influencia del enriquecimiento ambiental sobre ellas puede ser variable.

El enriquecimiento ambiental mejora a su vez algunos aspectos sensoriomotores. En ratones C57BL/6 el enriquecimiento postnatal modula la maduración del sistema visual modificando la agudeza visual (Prusky et al. 2000; Cancedda et al. 2004), de hecho una de las estructuras más engrosadas tras enriquecimiento es la corteza visual. Además se ha descrito que los ratones C3H escalan mejor al estar estabulados en un ambiente enriquecido (Benaroya-Milshtein et al. 2004). El efecto del enriquecimiento sobre la actividad es muy variable en ratones. Así, en la cepa BXSB se produce un incremento de actividad locomotora (Boehm et al. 1996) mientras que en BALB/c y C57BL/6 no se observan variaciones (Chapillon et al. 1999).

Finalmente, el enriquecimiento ambiental puede afectar a la actividad exploratoria. En experimentos realizados en rata utilizando la prueba de la tabla de agujeros, se observó un aumento del número de exploraciones y del tiempo de exploración (Escorihuela et al. 1994; Fernandez-Teruel et al. 1992).

5.2. Efectos del enriquecimiento en modelos murinos de enfermedades neurológicas de SNC

Los resultados beneficiosos del enriquecimiento ambiental no sólo han sido demostrados en animales sanos. Efectivamente, en varios modelos murinos de enfermedades neurológicas se observa cierta reversión de las alteraciones asociadas a la patología. Es el caso del modelo murino del síndrome de X frágil, enfermedad que cursa con retraso mental (Grossman et al. 2001; Restivo et al. 2005) o el modelo de anulación de la subunidad 1 del receptor de NMDA en CA1 (Rampon et al. 2000), en los que se ha descrito cierto rescate de los déficit cognitivos en la realización de pruebas de aprendizaje y memoria. El enriquecimiento ambiental temprano incluso puede modular la función motora como se ha visto en el modelo murino de Huntington en el que se previene la pérdida de volumen cerebral y se retrasa la instauración de alteraciones motoras (Hockly et al. 2002; Spires et al. 2004a), pero no se consigue revertir las alteraciones del fenotipo

dendrítico que se caracteriza por una disminución tanto en la densidad como en la longitud de las espinas dendríticas (Spires et al. 2004b). La estabulación en condiciones enriquecidas de los animales del modelo de enfermedad de Parkinson inducido mediante inyección de MPTP, reduce la intensidad del daño neuronal (Faherty et al. 2005).

Por último, el enriquecimiento ambiental puede paliar los efectos degenerativos asociados al envejecimiento. Datos provenientes de estudios epidemiológicos indican una relación inversa entre el "nivel educativo" y el riesgo de EA (Evans et al. 1997) lo que se ha interpretado como que la actividad intelectual tendría un efecto neuroprotector. De hecho, el enriquecimiento ambiental en modelos transgénicos de EA provoca una pronunciada reducción de los niveles de péptido Ab y de los depósitos amiloides (Lazarov et al. 2005) así como una recuperación de los déficit en memoria visuo-espacial (Arendash et al. 2004). La pérdida sináptica asociada a la edad puede ser prevenida mediante enriquecimiento ambiental (Saito et al. 1994). A nivel conductual, el enriquecimiento ambiental de forma continuada (no ocasional) en animales viejos, retrasa la aparición de alteraciones en aprendizaje y memoria visuo-espacial relacionadas con el envejecimiento (Fernandez-Teruel et al. 1997; Steimer et al. 1998; Frick et al. 2003; Bennett et al. 2006), y mejora otros parámetros como la actividad motora y exploratoria, especialmente en los animales viejos que no poseen alteraciones importantes previas (Fernandez et al. 2004), por lo que el enriquecimiento ambiental aplicado incluso a edades adultas, produce cambios sustanciales en la plasticidad sináptica que repercuten beneficiosamente en el proceso degenerativo del envejecimiento (Kohl et al. 2002).

En modelos de SD, se han realizado estudios de enriquecimiento ambiental en el ratón Ts65Dn. Sin embargo, los efectos sobre la actividad motora y la memoria espacial muestran una fuerte dependencia del sexo (Martinez-Cue et al. 2002). Así, en los ratones macho se observó un incremento de la actividad mientras que en las hembras se redujo, probablemente debido a una disrupción de la conducta espontánea como consecuencia del enriquecimiento. En cuanto a la memoria visuoespacial, mientras que en las hembras trisómicas ayudó a revertir el déficit, en los machos control no modificó el aprendizaje y empeoró en la ejecución de los ratones Ts65Dn machos. De hecho, recientemente se ha sugerido que el exceso de estimulación social o física en los ratones macho de este modelo podría afectar a la

cognición a través de la alteración de componentes emocionales y conductuales del proceso de aprendizaje (Martinez-Cue et al. 2005). Así, los animales macho trisómicos presentan mayor subordinación que los controles, por lo que un ambiente enriquecido asociado a un incremento de los estímulos sociales y físicos aumenta su grado de estrés repercutiendo en los procesos cognitivos. Los resultados comportamentales obtenidos en este modelo se correlacionan con cambios neuromorfológicos. Así, mientras las hembras control muestran un incremento en la complejidad dendrítica y en el número de espinas tras el enriquecimiento ambiental, en las ratonas Ts65Dn no se observa una alteración ni en el número ni en la densidad de las espinas (Dierssen et al. 2003), sugiriendo que las alteraciones en la circuiteria cerebral limitan tanto la capacidad de plasticidad sináptica que no pueden ser revertidas mediante el enriquecimiento ambiental, por lo que los beneficios a nivel conductual no resultan llamativos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



1. HIPÓTESIS

La hipótesis del efecto de dosis génica en el síndrome de Down (SD) se basa en que el desequilibrio de dosis de genes específicos conduciría a niveles elevados de proteínas concretas con consecuencias fenotípicas. Sin embargo sólo algunos de ellos podrán tener consecuencias observables debido a posibles efectos compensatorios. Proponemos que Dyrk1A es uno de esos genes dosis-sensibles que en base a su patrón de expresión y a los sustratos de fosforilación identificados, podría participar en las alteraciones motoras, cognitivas y el proceso neuropatológico tipo EA en personas con SD a través de la afectación de la neuritogénesis y la neuroplasticidad.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral consiste en determinar el papel del gen DYRK1A en el proceso degenerativo presente en el SD, tanto durante el neurodesarrollo como el asociado al envejecimiento y sus mecanismos patogénéticos, utilizando como aproximación experimental modelos de ratón genéticamente modificados con diferente dosis de este gen. Se aborda la descripción y caracterización del impacto de cambios en los niveles de expresión de Dyrk1A en el proceso neurodegenerativo y se estudian los aspectos mecanísticos que posiblemente subyacen a estos procesos, tanto a nivel neuroquímico, centrándonos en dos sistemas de neurotransmisión específicamente relacionados con función cognitiva, como a nivel celular, donde principalmente abordamos aspectos relacionados con neuritogénesis.

Los objetivos concretos son:

1. Determinar la implicación de Dyrk1A en el proceso neurodegenerativo asociado al envejecimiento en el SD analizando los cambios provocados con la edad en el patrón conductual y cognitivo de modelos murinos con diferente dosis de este gen y relacionándolos con las alteraciones fenotípicas del SD.
2. Dilucidar las alteraciones en los sistemas de neurotransmisión afectados por el incremento o la reducción de expresión de Dyrk1A, subyacentes a las alteraciones cognitivas y conductuales.
3. Estudiar los cambios celulares provocados por la sobreexpresión de Dyrk1A en el proceso de neuritogénesis y en la dinámica de la actina.
4. Analizar la afectación de la neuroplasticidad derivada de la sobreexpresión de Dyrk1A mediante experimentos de enriquecimiento ambiental.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. MODELOS ANIMALES

Para la realización de los experimentos se han empleado dos modelos de ratones genéticamente modificados con diferentes niveles de expresión de Dyrk1A: un modelo de haploinsuficiencia (Dyrk1A^{+/-}) y un modelo de sobreexpresión del gen (TgDyrk1A).

El modelo murino de pérdida de función de Dyrk1A fue generado por la Dra M. Arbonés sobre un fondo genético mixto C57BL/6-129/Ola (Fotaki et al. 2002). El ratón con anulación total del gen Dyrk1A no es viable y fallece entre los días E10.5-E13.5 de gestación. Por ese motivo, para la realización de los experimentos se ha utilizado el modelo murino de haploinsuficiencia con una única copia del gen murino Dyrk1A (Dyrk1A^{+/-}) utilizándose como animales control sus hermanos de camada no haploinsuficientes (DyrK1A^{+/+}). Los animales empleados en los experimentos se obtuvieron a partir del cruce de hembras Dyrk1A^{+/+} con machos Dyrk1A^{+/-}. El estudio de este modelo permite comprender el impacto de cambio de dosis frente a la pérdida completa de función.

El ratón transgénico de sobreexpresión de Dyrk1A (TgDyrk1A) había sido generado por la Dra C. Fillat mediante microinyección del transgén en embriones extraídos de hembras C57BL/6J/SJL (Charles River, España) y posterior reimplantación en hembras pseudogestantes. El transgén se construyó empleando la secuencia del gen Dyrk1A de rata que presenta una elevada conservación con su homólogo en ratón (Song et al. 1996) y para su regulación se situó bajo el promotor de la metalotioneína del cordero (sMT-1a) que es inducible por zinc (Altafaj et al. 2001) si bien en nuestros experimentos se utilizó el modelo sin inducción. Para la realización de los experimentos se han empleado dos líneas diferentes de este modelo con distintos puntos de inserción en el genoma del ratón para descartar posibles efectos posicionales en el análisis del fenotipo. Ambas líneas poseen diferente número de copias del transgén (línea 9, 2 copias y línea 33, 5 copias), si bien el nivel de sobreexpresión de proteína es comparable (Altafaj et al. 2001). La colonia se ha mantenido mediante el cruce de machos transgénicos con hembras C57BL/6J/SJL. En los experimentos se han considerado como controles aquellos hermanos de camada que no presentaban el transgén.

La genotipación de ambos modelos se realizó mediante PCR a partir del DNA genómico obtenido de la cola del animal. En el caso de los ratones Dyrk1A+/- se empleó la combinación de cebadores neoT (5'-ATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATC GCC-3'), Dyrk1A-P1 (5'-CTTATGACAGAGTGGAGCAA-3') y Dyrk1A-P2 (5'-CGTGAT GAGCCCTTACCTATG-3'). En el caso de los ratones TgDyrk1A se utilizaron el par de cebadores DyrkF (5'-GTCCAAACTCATCAATGTATC-3') y DyrkR (5'-CTTGAGCACAG CACTGTT-3').

Tras la genotipación, los animales fueron separados en función del sexo y los hermanos de camada se estabularon compartiendo la misma jaula en grupos de un máximo de 5 animales por jaula con acceso libre a comida y agua. Las colonias de animales se mantuvieron en dos estabularios diferentes, inicialmente en el perteneciente al Institut de Recerca Oncologica (IRO) y de forma posterior, debido al traslado de laboratorio al centro de Regulación Genómica, en el Institut Municipal de Investigacions Mèdiques (IMIM), siendo en ambos casos, las condiciones ambientales de estabulación referentes a la humedad (60%) y temperatura (21±2°C) las recomendadas por FELASA y con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (07:00-19:00).

Los experimentos se han realizaron siguiendo los procedimientos aprobados por el comité ético del Institut de Recerca Oncologica y del Parc de Recerca Biomedica de Barcelona, cumpliendo la normativa establecida por las directrices de la Comunidad Europea 86/609/EEC para el apropiado cuidado y uso de animales con fines de investigación.

2. CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL

Los experimentos se realizaron en dos cortes diferentes de edad: animales adultos y animales viejos. Para los experimentos realizados en la etapa adulta se emplearon animales con edades comprendidas entre 7 y 12 meses, mientras que los animales viejos oscilaban entre 20 a 24 meses de edad. En el caso del modelo de haploinsuficiencia, debido a las dificultades en la generación de un gran número de animales, se han utilizado ambos sexos, mientras que en el modelo de transgénesis sólo se han empleado animales machos en los experimentos. Esta misma razón ha determinado que algunos de los experimentos se hayan realizado

únicamente en el modelo transgénico. Las pruebas conductuales en los experimentos de enriquecimiento ambiental se realizaron con ratones de 2 meses de edad.

Durante la última década, la fenotipación conductual de modelos murinos genéticamente modificados ha adquirido una gran relevancia en el estudio de genes candidatos que participan en procesos relacionados con el SNC, convirtiéndose en una herramienta imprescindible para determinar la implicación de ciertos genes en las patologías del SNC. En la actualidad, la evaluación conductual está muy extendida y existen protocolos firmemente establecidos muy rigurosos con las condiciones de actuación, que permiten la replicación de los resultados entre laboratorios.

Además del mantenimiento estable de las condiciones ambientales (nivel de luz, nivel basal de ruido, temperatura y humedad) durante la experimentación, para reducir el estrés del animal, es importante habituarlo al manejo por parte del experimentador, para ello, durante al menos 4-6 días antes a la prueba, cada animal fue manipulado durante 3 min exhaustivamente. Las pruebas se realizaron en un laboratorio separado espacialmente de la zona de estabulación en la misma franja horaria del día, coincidiendo con las primeras horas del comienzo del ciclo de luz clara, durante un margen de tiempo no superior a tres horas. Para minimizar la posible influencia de unas pruebas conductuales sobre las otras, éstas se realizaron secuencialmente con una graduación ascendente de estrés. En todo caso, si a pesar de estas medidas, se observaban signos de estrés (como estereotipias o conductas de flotación) los animales que las manifestaban eran descartados.

Por otro lado, debido a la gran variabilidad interindividual existente, en las pruebas conductuales es necesario emplear un número de animales (N) elevado. En esta tesis, siempre que la disponibilidad lo ha permitido se empleó una N de animales superior a 10 para los experimentos conductuales.

Además de las baterías generales somatosensoriales y neurológicas, se han empleado pruebas específicas neuropsiquiátricas y cognitivas.

2.1. Pruebas neurosensoriales y sensoriomotoras

Al iniciar la caracterización del fenotipo conductual de un modelo murino es importante realizar una serie de experimentos que permiten detectar alteraciones importantes en los diferentes sistemas neurosensoriales. De este modo, si la integridad de los sistemas es la adecuada, podemos descartar la influencia de elementos inespecíficos en las alteraciones observadas en pruebas de una mayor complejidad y podrán diseccionarse más fácilmente los sistemas neurales afectados.

La evaluación neurosensorial inicial se realizó basándose en la batería primaria de pruebas del protocolo SHIRPA (Rogers et al. 1997). La utilización de este protocolo en la evaluación neurológica está muy extendida actualmente, siendo una herramienta fundamental en los proyectos de caracterización de modelos murinos genéticamente modificados. Esta batería está aceptada dentro de la plataforma europea de fenotipación EUMORPHIA, a la cual pertenece nuestro grupo. La batería primaria de pruebas del SHIRPA se basa en 40 medidas semicuantitativas cuyo objetivo es obtener una evaluación preliminar de la integridad de los sistemas neurosensoriales. Se trata de un protocolo observacional en el que se coloca el ratón en el interior de un cubículo cilíndrico transparente de Perpex (15 cm alto, 11 cm diámetro) y se observa durante 5 min su comportamiento registrando actividad, estereotipias realizadas, aspecto general, erizamiento del pelo. Posteriormente se pesa al animal y se traslada a una caja de metacrilato transparente (56 X 34 X 19 cm) en la que se realizan las pruebas. En la tabla adjunta (ver a continuación) se describe cada prueba realizada y su valoración, así como los sistemas neurosensoriales involucrados.

PRUEBA	DESCRIPCIÓN	VALORACIÓN	SISTEMA NEUROSENSORIAL
Respuesta de alcance	Cogiendo al animal por la cola se acerca a una superficie plana	0 = no extiende las patas 1 = extiende tras el contacto con la superficie 2 = extiende tras el contacto de bigotes 3 = antes de contactar con los bigotes 4 = extiende las patas al iniciar el acercamiento	Visión/ Vestibular
Capacidad visual	Sujetando al animal en suspensión por la cola se le acerca un lápiz	0 = no extiende las patas 1 = extiende tras el contacto con el lápiz 2 = extiende antes de contactar con los bigotes	Visión
Respuesta de sobresalto	Se produce un sonido de 50 db mecánico	0 = sin reacción 1 = mueve pabellón auricular 2 = salta 1 cm 3 = salta más de 1 cm	Audición
Enroscamiento	Se coge al animal por la cola	0 = sin enroscamiento 1 = enroscamiento	Sistema vestibular
Reflejo enderezamiento	Se lanza al animal produciendo un giro	0 = cae sobre las patas 1 = cae de lado y se incorpora 2 = cae de espaldas y se incorpora 3 = cae de espaldas y no puede girarse	Sistema vestibular
Geotaxia negativa	Se coloca al animal mirando hacia abajo en una gradilla metálica	0 = gira y asciende por la gradilla 1 = gira y se queda parado 2 = se mueve pero sin girar 3 = no se mueve en 30 segundos 4 = se cae	Sistema vestibular Fuerza muscular
Reflejo corneal	Se acerca una torunda al ojo del animal	0 = sin reacción 1 = un parpadeo 2 = múltiples parpadeos	Reflejo corneal
Reflejo de retirada de pabellón auricular	Se toca el extremo del pabellón auditivo con una torunda	0 = sin reacción 1 = retrae un poco el pabellón auricular 2 = retrae muchas veces el pabellón auricular	Tacto
Respuesta de escape	Se toca la espalda del animal con el dedo	0 = sin reacción 1 = escapa tras tocarlo con firmeza 2 = escapa rápidamente tras un leve toque 3 = escapa sólo al aproximarse	Tacto/ Reflejo
Reflejo de retirada de la pata	Con unas pinzas se presiona la pata trasera del animal en la articulación	0 = sin reacción 1 = retracción de la pata suave 2 = retracción de la pata moderada 3 = retracción de la pata rápida 4 = retracción de la pata muy vigoroso y repetido	Nocicepción
Piloerección		0 = ausente 1 = presente	Ansiedad/excitación
Elevación de la cola	Se observa el grado de elevación de la cola	0 = flácida 1 = posición horizontal 2 = elevada (cola de Straub)	Ansiedad/excitación

Como pruebas complementarias a la batería SHIRPA se ha realizado un análisis exhaustivo del fenotipo neurológico en los modelos utilizados. Para ello se ha empleado una batería de pruebas neuromotoras:

- de equilibrio
- de coordinación (percha, rodillo giratorio, cinta giratoria sinfin)
- de fuerza muscular
- de natación
- análisis de la marcha (paw print)

Prueba de equilibrio



Esta prueba permite evaluar el equilibrio del ratón y depende de la integridad del sistema vestibular para su correcta realización.

Brevemente, la prueba consiste en colocar al ratón en el centro de una barra de madera (50 cm largo x 12 mm ancho) elevada a una altura de 40 cm durante un periodo de 40 s. Se evalúa asignando diferentes puntuaciones en función de la actividad que el ratón desarrolla en la barra, de este modo si el ratón cae la puntuación será 0, si se mantiene en el centro de la barra será 1, si se mueve del centro 2, y 3 si se desplaza hasta el extremo de la barra. También se registra el tiempo que permanece en la barra mediante la latencia de caída.

Prueba de la percha



La prueba de la percha se utiliza para analizar el reflejo prensil, la capacidad de tracción y la coordinación motora. Consiste en una percha metálica elevada 40 cm sobre el suelo. El reflejo prensil se evalúa suspendiendo al ratón de la percha por las extremidades delanteras durante

5 s. Se puntúa: 0 si cae y 1 si se mantiene agarrado a la percha. La capacidad de tracción puede medirse en función del número de patas traseras que el animal consigue elevar a la percha, la puntuación será 0 si no consigue alzar las patas, 1 si eleva una pata y 2 si logra alzar las dos patas traseras. Se realizan tres ensayos consecutivos de esta prueba. Finalmente, se coloca de nuevo el animal en la percha y durante 60 s se registra la latencia de caída, la latencia de llegada al extremo de la percha y el número de desplazamientos realizados.

Prueba de fuerza muscular



La fuerza muscular ejercida por las patas delanteras fue evaluada empleando un procedimiento descrito por Meyer (Meyer et al. 1979) y adaptado por Costa (Costa et al. 1999). Se emplea un dinamómetro acoplado a una rejilla que se activa al aplicar una fuerza sobre ella (Grip Strength Meter, Bioseb, Francia). Se realizaron dos ensayos: en el primer ensayo, el animal se sostiene por la cola y se colocan sus patas delanteras sobre la rejilla. Seguidamente se ejerce una suave tracción sobre la cola en la dirección opuesta al aparato de modo que el animal debe vencer la fuerza ejercida sujetándose a la rejilla; en un segundo ensayo, se utiliza la modificación realizada por Costa (Costa et al. 1999) en la que para evitar el componente humano de la prueba, se coloca al animal verticalmente asido del extremo de la rejilla. En este caso el animal debe sujetarse y vencer la fuerza constante ejercida por la gravedad y su propio peso para evitar la caída sobre una superficie esponjosa colocada 25 cm por debajo del aparato. Por ello, los datos obtenidos se corrigen en función del peso de cada animal.

Análisis de la marcha



El patrón de la marcha fue evaluado empleando un método previamente descrito por Barlow (Barlow et al. 1996). Se utiliza un túnel estrecho, largo y oscuro de plexiglax (10 x 10 x 70 cm) con una hoja de papel de filtro en la base que permite obtener marcas de tinta en cada pisada. Se analiza un tramo más corto que la longitud del túnel para evitar artefactos en la prueba propios de la trayectoria o debidos a elementos aversivos y no a las posibles alteraciones motoras existentes. Las patas traseras se tiñen con tinta no tóxica y al animal se le coloca en el inicio del túnel. Los ratones de forma espontánea tienden a entrar en el túnel y lo recorren dejando la impronta de sus huellas registrada en el papel. Se realizaron tres ensayos por animal. Para el análisis de los registros de las pisadas se seleccionaron tramos continuos de 20 cm en los que la marcha era constante excluyendo las huellas iniciales y finales. Se analizó la longitud de paso definida como la distancia media existente entre dos pisadas realizadas con la misma extremidad, y la anchura de paso que hace referencia a la distancia media existente entre la pisada izquierda y derecha.

Rodillo giratorio (Rotarod)



El rodillo giratorio (PANLAB SA, España) consiste en unos rodillos (5 cm de diámetro y 10 cm de largo) elevados a 20 cm del suelo que pueden girar a diferentes velocidades constantes entre 4 y 40 rpm o generar un ciclo de aceleración.

Los ratones se colocan sobre los rodillos perpendicularmente al eje de rotación y en dirección contraria al movimiento y deben mantener el equilibrio sobre el rodillo en movimiento. En la base del aparato hay unas placas magnéticas acopladas a un sistema que detecta la caída del ratón y se registra el tiempo de permanencia sobre el rodillo. Esta prueba permite analizar el aprendizaje motor, la coordinación motora y el equilibrio. Para estudiar el aprendizaje motor se sometió al ratón a sesiones repetidas a la velocidad de rotación mínima de los rodillos (4 rpm). Se considera que ha aprendido la tarea en el momento en que el ratón puede mantenerse sobre el rodillo durante 180 min (criterio de ejecución). Se registró el número de sesiones que se habían requerido para alcanzar el criterio de ejecución. Para el análisis de la coordinación motora se registra la latencia de caída durante varias sesiones consecutivas a velocidades constantes crecientes de rotación del rodillo (7, 10, 14, 24 y 34 rpm), hasta un tiempo máximo de permanencia de 5 min. Finalmente, se sometió a los animales a un ciclo de aceleración en el que la velocidad del rodillo pasa de 4 a 40 rpm en 1 min de tiempo. En todos los casos, el tiempo de recuperación entre ensayos fue de 20 min.

Cinta giratoria sinfín (treadmill)



La cinta giratoria sinfín permite estudiar la marcha y la coordinación motora. Consiste en una cinta de 50 cm de largo y 20 cm de ancho que puede girar a diferentes velocidades entre 5 y 150 cm/s y a la que se puede proporcionar una inclinación variable (de 0° a 45°) (PANLAB SA, España). Al final de la cinta se sitúa una rejilla electrificada que administra un shock de 0.4 mA en las patas si el animal no es capaz de andar. Al inicio del experimento, el animal se coloca en el extremo de la cinta orientado en dirección contraria al sentido del movimiento. Se registran el número de descargas recibidas (número de shock) y el tiempo acumulado que el ratón pasa sobre la rejilla sin reiniciar el movimiento sobre la cinta (tiempo de shock). Para evaluar el aprendizaje motor, se realizaron 2 ensayos a la velocidad mínima (5 rpm) con una

inclinación de 5 grados durante un tiempo máximo de 1 min. Posteriormente, con el fin de incrementar la dificultad de la tarea, se aumentó la inclinación (20 grados) y se realizaron diferentes ensayos a velocidades constantes crecientes (5, 10, 20, 30, 40 rpm) de una duración de 1 min. Se dejaron 20 min de descanso entre sesiones para permitir la recuperación de los animales.

Prueba de natación

El estudio del patrón de natación permite poner de manifiesto diferencias y alteraciones motoras sutiles que de otra manera son difíciles de detectar. Por otra parte es útil para determinar patrones aberrantes de natación que podrían interferir con la realización de algunas de las pruebas de aprendizaje. Para la realización de la prueba, los animales se colocan en el centro de un tanque de agua (120 cm de diámetro y 50 cm de profundidad) y mediante una cámara acoplada a un sistema de grabación de movimiento (SMART, PANLAB SA, España) se registra la trayectoria del ratón durante 10 min. La temperatura del agua es de $24^{\circ}\pm 1$ con el fin de reducir las condiciones estresantes de la prueba. El posterior análisis de las trayectorias se realiza mediante el programa Wintrack 2.4 (Wolfer et al. 2001) que permite calcular una serie de parámetros como la distancia recorrida, la velocidad de natación, latencia de inicio de movimiento, el tiempo de inmovilidad en el agua, el número de paradas, los cambios de dirección, la duración del inicio del movimiento y la tortuosidad, que proporcionan un análisis exhaustivo del patrón locomotor seguido por cada animal.

2.2. Estudio de actividad y conducta relacionada con ansiedad

Estudio de la actividad locomotora

La actividad motora se ha evaluado en dos condiciones diferentes: en un entorno familiar como es la jaula de actividad y en un entorno novedoso en la prueba del campo abierto.



La actividad basal se estudió en una caja de estabulación con una rueda giratoria de libre acceso (11.5 cm de diámetro y una superficie de 5 cm de ancho) acoplada a un contador magnético digital (PANLAB SA, España) que se activa con el movimiento

de la rueda. Los animales se estabularon individualmente, y se registró el número de revoluciones durante 72 h.



Mediante la prueba del campo abierto se evaluó la modificación de la actividad basal en un entorno novedoso. El aparato consiste en una superficie de plexiglás blanca de 100 x 100 cm cuyo suelo se divide en 25 cuadrantes de 20 x 20 cm mediante líneas negras y con paredes de 50 cm de altura. Los ratones se colocaron en el centro de la arena y durante 5 min se registró la trayectoria de los animales mediante un sistema de grabación situado por encima del aparato que estaba a su vez acoplado a un sistema informático encargado de procesar la señal (SMART, System Motor Activity Record and Tracking, PANLAB SA, España). Con este sistema se puede analizar la actividad horizontal del animal a través de parámetros como la distancia recorrida y la velocidad media. Además, permite diferenciar la actividad realizada en una zona central virtual (cuadrado central de 80 x 80 cm) considerada más ansiogénica, lo que permite evaluar el nivel de ansiedad. La actividad vertical fue registrada manualmente por el experimentador y hace referencia al número de enderezamientos. La prueba se realizó en condiciones poco aversivas (luz blanca 50 luxes).

Actividad exploratoria



Mediante la prueba de la tabla de agujeros se analizó la actividad exploratoria de los ratones en los experimentos de enriquecimiento ambiental dado que está descrito que esta intervención ambiental incrementa la tendencia exploratoria. El aparato consiste en una tabla (30 x 30 cm) con 16 agujeros equidistantes (3 cm de diámetro) (PANLAB SA, España). El animal tiende a realizar exploraciones introduciendo su cabeza dentro del agujero. En un único ensayo de 5 min se midieron el número de exploraciones y el tiempo de exploración en cada agujero, así como la actividad vertical realizada por el animal (número de enderezamientos).

Estudio de la ansiedad



Para estudiar de forma más específica conductas relacionadas con emotividad y con el nivel de ansiedad de los animales se empleó el laberinto en cruz elevado. El aparato consiste en una plataforma en

forma de cruz (cuatro brazos enfrentados dos a dos de una longitud de 40 cm y anchura de 8 cm) elevada del suelo 80 cm. Dos de los brazos enfrentados se protegen por unas paredes negras de metacrilato de 20 cm de altura y los otros dos quedan desprotegidos. Debido a la distancia al suelo, la zona de los brazos abiertos resulta un entorno aversivo para el ratón, que tiende a permanecer de manera natural en los brazos cerrados. Por ello, se consideran medidas de reactividad emocional, el número de entradas en brazos abiertos y la proporción de tiempo en éstos, de forma que animales con una menor conducta ansiosa obtendrán una puntuación más elevada en éstos. El experimento comienza cuando se coloca al ratón en el centro de la cruz mirando hacia uno de los brazos abiertos, y con el mismo sistema de video-análisis empleado en la prueba de campo abierto se registra su trayectoria durante 5 min. Se analizó el porcentaje de tiempo que el ratón permanecía en brazos cerrados y abiertos, la velocidad media y la distancia recorrida en las distintas zonas. La actividad vertical se determinó registrando el número de enderezamientos. El nivel de iluminación fue de 50 luxes (no ansiogénico).

2.3. Estudio de aprendizaje y memoria

En la actualidad pueden analizarse y diferenciarse distintos aspectos del aprendizaje y la memoria en ratones de laboratorio. En este trabajo se ha estudiado la memoria reciente, por su deterioro en los procesos neurodegenerativos, en especial en la EA, y el aprendizaje visuo-espacial por su dependencia de hipocampo, una estructura afectada en el SD.

Memoria reciente



Para evaluar la memoria reciente se empleó el paradigma de la evitación pasiva en la que el animal debe aprender a evitar un estímulo aversivo que en este caso es un shock eléctrico.

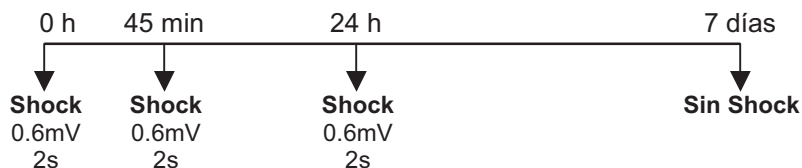
El aparato consiste en una rejilla circular electrificada en cuyo centro se localiza una plataforma circular (3 cm diámetro) sobre la que se coloca al ratón (PANLAB SA, España). La tendencia natural del animal es a descender inmediatamente después de haberlo colocado. En la sesión de entrenamiento el animal aprende que al bajar

de la plataforma recibe una descarga eléctrica de intensidad moderada (0.6mA). Un animal normal recordará la experiencia y en las sucesivas exposiciones al aparato inhibirá esta conducta espontánea. Durante la sesión de test se registra el tiempo que el ratón permanece sobre a plataforma (latencia de descenso).

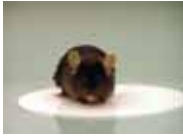
En esta prueba se utilizaron distintos protocolos en función de la edad del animal. El protocolo estándar empleado consistió en exponer al animal al aparato el primer día (sesión de entrenamiento) y administrar una descarga eléctrica (0,6mA, 2s). A las 24 h se analizó la memoria reciente exponiendo nuevamente al animal al aparato. Para evitar la extinción de la conducta, y dado que en el ratón a las 24 h no se obtienen valores excesivamente altos, tal como se pudo comprobar en una serie de experimentos preliminares, debido a la menor capacidad de inhibición motora que presenta frente a otras especies como la rata, se le administró otra vez el shock. A los 7 días se analizó la memoria a medio plazo de la misma manera pero en esta ocasión en condiciones de extinción.



Esta prueba ha sido ampliamente validada en rata, pero resulta más complicada de aplicar en ratón dado que es difícil inhibir su impulsividad, especialmente en animales jóvenes, por lo que es necesario reforzar el proceso de aprendizaje. Este efecto interfiere particularmente en los experimentos de enriquecimiento ambiental, ya que este tratamiento puede incrementar la actividad y la impulsividad. Por ello a los animales adultos jóvenes (2 meses de edad) sometidos a enriquecimiento ambiental, el primer día se les administraron dos sesiones separadas entre ellas 45 min.



Memoria visuo-espacial

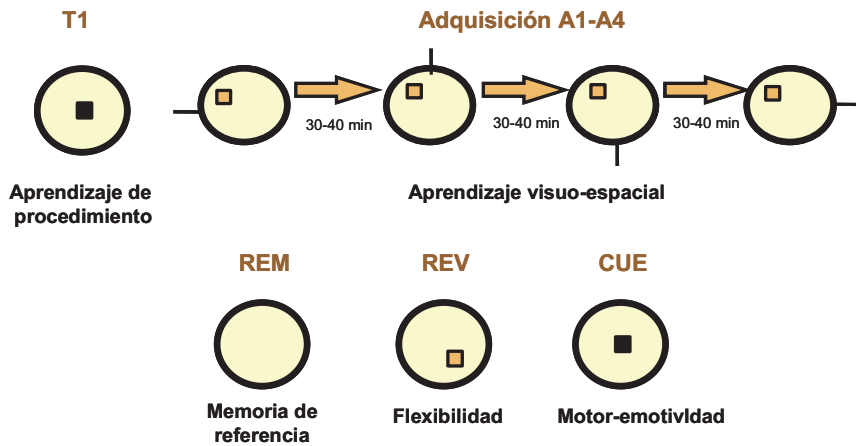


El aprendizaje y la memoria visuo-espacial se analizaron utilizando una versión modificada del paradigma del laberinto acuático de Morris (Morris water maze, MWM) (Morris 1984). Esta tarea, básicamente consiste en que los animales deben aprender la localización de una plataforma sumergida dentro de un tanque de agua que les sirve de escape del agua. Para ello, los animales deben construir un mapa cognitivo aloécéntrico basándose en una serie de puntos de referencia visuales externos. Se trata de una prueba que se considera que representa funciones cognitivas superiores en la especie humana y posee componentes espaciales y no espaciales dependientes de regiones cerebrales específicas.

Se utiliza un tanque de 120 cm de diámetro lleno de agua teñida con leche en polvo desnatada para ocultar la localización de una plataforma blanca circular (15 cm diámetro). La temperatura del agua se mantiene constante a 22-23°C mediante un termostato acoplado a una resistencia eléctrica colocada en el fondo del tanque. Entre cada ensayo se recogen las defecaciones y se remueve el agua para evitar la sectorización mediante señales olfativas. Cada ensayo tiene una duración total de 1 min y se deja un intervalo de aproximadamente 30-40 min entre ensayos, registrándose el tiempo que el animal necesita para encontrar la plataforma.

La prueba consiste en varios grupos de sesiones con objetivos diferenciales:

- Sesión de entrenamiento (sesión T1, ensayos 1-4) en que el animal aprende la tarea, permitiendo evaluar el aprendizaje de procedimiento.
- Sesión de adquisición (sesiones A1-A4, ensayos 1-4 por sesión) en que se evalúa el aprendizaje visuo-espacial
- Sesión de retirada de la plataforma (sesión REM, un único ensayo) en que se evalúa la memoria visuo-espacial.
- Sesión de cambio de posición de la plataforma (sesión REV, ensayos 1-4) en que se evalúa la flexibilidad cognitiva.
- Sesión de aprendizaje guiado (sesión CUE, ensayos 1-4) en que se descartan posibles alteraciones motoras o de emotividad.



En la sesión de entrenamiento los ratones aprenden la tarea y se les muestra la existencia de una plataforma como elemento de escape del agua. La plataforma se coloca en la posición central para evitar generar una preferencia espacial, sobresaliendo ligeramente del agua y con una señal visual local marcando su posición. Las señales visuales locales no generan en principio aprendizaje alotético, sino idiotético basado en señales internas y locales, por lo que no interferimos en el resto de la prueba. Se realizan cuatro ensayos por ratón introduciéndolos al azar por diferentes posiciones de entrada (N norte, S sur, E este, O oeste) en cada sesión. Si el animal no consigue localizar la plataforma en un minuto de tiempo es colocado sobre ella durante 20 s para favorecer el aprendizaje de la tarea.

Durante los 4 días siguientes se realiza las sesiones de adquisición (A1-A4). La plataforma es colocada por debajo del nivel del agua en el cuadrante noroeste separada 20 cm de la pared del tanque y se sitúan varias señales visuales distales en las cortinas que rodean al tanque. Cada sesión consta de 4 ensayos en los que se introduce aleatoriamente al animal por las diferentes posiciones de entrada. En el caso de que no llegue a la plataforma, al igual que en la sesión de aprendizaje, se coloca al animal durante 20 s sobre la plataforma para favorecer el aprendizaje de la ubicación de la misma orientándose mediante las señales visuales distales.

Tras 48 h de descanso, se retira la plataforma del tanque (fase de retirada o "removal") y se introduce al animal por la posición más lejana a la plataforma (S) dejándole nadar libremente durante 1 min. Se registra el tiempo que el animal permanecía en el cuadrante entrenado, medida del estado de la memoria visuo-espacial.

El MWM permite analizar la denominada flexibilidad cognitiva del animal, entendiéndose como tal, la capacidad de olvidar una tarea aprendida para adquirir nuevos conocimientos. En esta sesión la plataforma se coloca sumergida en el cuadrante opuesto al previamente entrenado (sureste) y se introduce de forma aleatoria al animal en 4 ensayos por las distintas posiciones de entrada. A lo largo de la sesión el animal debe reconocer el cambio de la posición y aprender la nueva localización.

Finalmente, con el fin de descartar artefactos derivados de posibles diferencias en emotividad, capacidad de natación o agudeza visual se realiza una sesión de aprendizaje guiado o "cued session". En esta sesión se rodea el tanque con cortinas eliminando así las señales visuales distales y se coloca la plataforma de forma visible (2 cm por encima del agua) y señalizada mediante una señal visual local. Se realizan nuevamente 4 ensayos por ratón y se registran los mismos parámetros que en las sesiones de adquisición permitiendo determinar la existencia de factores ajenos al aprendizaje que pudieran estar interfiriendo en la realización de la tarea.

Todas las sesiones son grabadas y analizadas posteriormente mediante el programa SMART (ver más arriba) lo que permite determinar aparte de la latencia de llegada a la plataforma, otros parámetros como la velocidad de natación, la distancia recorrida y los porcentajes de tiempo en cada cuadrante, que se ha demostrado que reflejan de forma muy fidedigna el aprendizaje visuo-espacial.

3. CARACTERIZACIÓN NEUROMORFOLÓGICA

3.1. Inmunohistoquímica

Durante la realización de esta tesis se han empleado técnicas inmunohistoquímicas que permiten detectar la expresión de determinadas proteínas en un tejido que mantiene su integridad estructural. Estas técnicas requieren la fijación del tejido. Para ello, los animales fueron sacrificados con isoflurano y perfundidos a través del ventrículo izquierdo con 50 ml de PBS 0.1M, pH = 7.4 (Sambrook et al. 1989), seguido de 100 ml de paraformaldehído (PFA) frío al 4% en PBS mediante una bomba peristáltica (30 ml/min). Una vez perfundido, se extrajo el cerebro con

cuidado y se postfijó a 4°C usando el mismo fijador. A las 24 h el cerebro se sumergió en una solución de sacarosa al 30% y se congeló a -80°C. Se obtuvieron secciones coronales en criostato de 50 µm distribuidas en 3 series que se conservaron a -20°C en una solución crioprotectora (30% glicerol, 30% etilenglicol, 40% PBS).

Con ayuda del atlas estereotáxico del cerebro de ratón (Franklin and Paxinos 1997) se seleccionaron las secciones correspondientes a los núcleos de interés. Tras realizar 2 lavados en flotación con PBS 0.1M de 5 min, se eliminaron las peroxidasas endógenas del tejido con un tratamiento de agua oxigenada al 3% y metanol al 10% en PBS 0.1M de 30 min. Para eliminar esta solución, los cortes se lavaron 2 veces durante 5 min con PBS 0.1M y se trataron 3 veces durante 5 min con PBS con Tritón al 0.2% (PBS-T) para incrementar la permeabilidad del tejido y favorecer el acceso del anticuerpo. A continuación durante 1 h a TA se realizó el bloqueo con suero fetal bovino al 10% en PBS-T más gelatina al 0.25% (PBS-T-GEL) para evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo. El anticuerpo primario se diluyó a la concentración necesaria en una solución de PBS-T-GEL con suero fetal bovino al 5% (PBS-T-FBS) y se expuso al tejido durante toda la noche a 4°C. Las diluciones de los anticuerpos empleados se recogen en la tabla adjunta. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS-T y se incubaron durante 1 h a TA en la solución PBS-T-GEL con FBS al 5% y con el anticuerpo secundario biotinilado (1:250, Vector, UK) correspondiente al huésped en el que se generó el primario. Seguidamente se realizaron de nuevo 3 lavados de 5 min con PBS-T y se incubó durante 1 h 30 min a TA con el complejo AB previamente preparado según instrucciones de fabricante (Vector, UK). Para eliminar la solución del paso anterior se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS-T y 2 lavados de 5 min con PBS. Finalmente se procedió al revelado empleando una solución con diaminobenzidina (DAB) 0.05% y de agua oxigenada 0.03% en PBS que reacciona con la peroxidasa conjugada a la estreptavidina. El tiempo de revelado oscilaba entre 2-5 min en función del anticuerpo empleado. Finalmente, los cortes fueron lavados nuevamente 3 veces durante 5 min con PBS y montados sobre portaobjetos previamente gelatinizados y se dejaron secando a temperatura ambiente hasta el día siguiente.

En la mayoría de los casos al día siguiente se realizó una contratinción suave con violeta de cresilo para facilitar la identificación de los núcleos celulares y se deshidrataron las muestras mediante una batería de alcoholes de graduación

ascendente finalizando en xilol. Los cubreobjetos se montaron empleando el producto Eukit (Electron Microscopy Science, USA).

Anticuerpo	Siglas	Dilución	Casa comercial
Colino acetil transferasa	Chat	1:1000	Chemicon
Receptor p75 NGF	P75	1:6000	Chemicon
Tirosin hidroxilasa	TH	1:8000	Sigma

3.2. Estereología

Durante el desarrollo de esta tesis se ha realizado el conteo celular de los núcleos SNpc, VTA, ST, MSN y VDB, basándose en principios estereológicos (Gundersen and Jensen 1987). Para ello se utilizó un microscopio OLYMPUS BX51 conectado a una videocámara y con una platina motorizada conectada a un controlador automático de las tres dimensiones espaciales (microcator). Se empleó el programa informático CAST-GRID (Olympus, Alemania) que intervenía en el movimiento en dirección XY de la platina y permitía el muestreo sistemático al azar de los campos seleccionados.

Mediante el método de Cavalieri se realizó la estimación del volumen de referencia (V_{ref}) de los diferentes núcleos estudiados. Para ello en cada sección se lanza una retícula de puntos. Cada punto tiene asociado una determinada área, de manera que contando el número de puntos y multiplicándolo por su área se obtuvo una estimación del área de cada sección. El V_{ref} de la estructura se calculó mediante la siguiente fórmula siendo A_i el área por sección y t_i la distancia entre secciones: $V_{ref} = \sum A_i t_i$

La estimación de la densidad neuronal (N_v) se calculó aplicando el método del disector óptico. El programa genera disectores que se superponen sobre la imagen capturada por la videocámara visible en el monitor. Con el fin de contar las células se delimitaron las secciones y se lanzó un número de disectores proporcional al 10% del área de cada sección analizada. El área del disector (S_{dis}) era $1726 \mu\text{m}^2$ y la altura (H_{dis}) $15 \mu\text{m}$ ($V_{dis} = S_{dis} \times H_{dis} = 25890 \mu\text{m}^3$). Como el espesor total de la sección era de $25 \mu\text{m}$ aproximadamente, se mantuvo una distancia de seguridad de $5 \mu\text{m}$ por encima y por debajo de la sección óptica para evitar la producción de

artefactos sobre la superficie física de la sección. Para elegir qué células contar se siguió la regla de Sterio (Sterio 1984) de manera que solamente se consideraron aptas para el recuento aquellas células que aparecían en el plano focal superior y que no eran observadas en el plano focal inferior de observación. Para evaluar la precisión de las estimaciones se calculó el coeficiente de error ($CE = E.M.M./media$) de acuerdo con Gundersen (Gundersen and Jensen 1987). Finalmente, la estimación del número total de neuronas ($N(neu)$) se obtuvo aplicando la fórmula: $N(neu) = N_v \times V(ref)$, El factor de retracción FR que es un parámetro que evalúa la retracción tisular experimentada por el tejido tras el procesamiento, fue aproximadamente de 15 μm .

3.3. Inmunoensayo (ELISA)

Dado que el adecuado funcionamiento de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal depende del apropiado suplemento de NGF aportado por las regiones diana del sistema colinérgico, se determinó la concentración de este factor trófico en diferentes áreas involucradas en el sistema colinérgico. Para ello, se utilizó un sistema de inmunoensayo (ELISA) que permite detectar concentraciones de una proteína del orden de pg/ml.

Obtención de extractos proteicos y cuantificación

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y del cerebro se diseccionó corteza, hipocampo y prosencéfalo basal. Tras pesar el fragmento deseado, se disgregó mecánicamente en un homogenizador de vidrio (dounce) junto con 10 volúmenes del tampón de lisis (NaCl 137 mM, 20 mM Tris-HCl (pH = 8), NP40 1%, glicerol 10%, PMSF 1 mM, aprotinina 10 $\mu g/ml$, leupeptina 1 $\mu g/ml$ y vanadato sódico 0.5 mM). A continuación, se centrifugó la muestra durante 30 min a 13000 g a 4°C y se recogió el sobrenadante que contenía las proteínas solubles.

Para la cuantificación del extracto proteico se empleó el kit BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Inmunoensayo (ELISA)

La detección de NGF mediante ELISA se realizó utilizando el kit comercial NGF E_{max}[®] ImmunoAssay System (Promega, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se usaron placas de 98 pocillos que se incubaron durante toda la noche con una solución del anticuerpo policlonal anti-NGF (pAb) al que posteriormente se unirá la fracción soluble de NGF. Tras lavar las placas con PBS-T durante 1h se incubaron con la solución de bloqueo. Se prepararon por duplicado 500 µg de cada muestra proteica y una curva patrón de NGF (500-8 pg/ml). La placa se incubó en agitación durante 6 h con las muestras y se lavó 5 veces con PBS-T. A continuación, se incubó sin agitación durante toda la noche con un anticuerpo monoclonal secundario anti-NGF (mAb) que se une al NGF capturado. Finalmente, tras ser lavada 5 veces, se detectó el anticuerpo mAb unido usando un anticuerpo específico de la especie del hospedador conjugado con la peróxidasa del rábano como reactivo terciario. Tras la incubación con un sustrato cromógeno, se produjo una reacción de oxidación-reducción con el consiguiente viraje del color. La cantidad de NGF fue proporcional a la intensidad de color generado.

4. CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA EN LOS MODELOS CON DIFERENTE NIVELES DE EXPRESIÓN DE DYRK1A

Los resultados obtenidos en los experimentos de caracterización conductual mostraron un claro fenotipo motor en los modelos de estudio. Uno de los sistemas relacionados con el control motor es el sistema dopaminérgico el cual a su vez juega un papel fundamental en procesos cognitivos. Con el fin de caracterizar el sistema dopaminérgico en ambos modelos de Dyrk1A, se realizaron ensayos farmacológicos que constituyen una herramienta muy útil para poner de manifiesto alteraciones en los sistemas de neurotransmisión.

El estado cataléptico, definido como la ausencia de cualquier tipo de movimiento a excepción de los movimientos característicos de la respiración, puede inducirse mediante el bloqueo de los receptores dopaminérgicos que provoca la inhibición de la neurotransmisión dopaminérgica a través de la vía nigroestriatal (Marin et al.

1993). Para bloquear los receptores tipo D1 se empleó el antagonista selectivo R(+)-7-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidrol H-3-benzazepina (SCH-23390; Sigma/RBI, USA), mientras que para los receptores tipo D2 se eligió el antagonista haloperidol (Sigma/RBI, USA). Ambos fármacos se disolvieron en el vehículo (solución salina 0.9%) a diferentes dosis (SCH23390: 0.5, 1 y 1.5 mg/kg; haloperidol: 0,5, 1, 2 y 4 mg/kg) y se administraron 30 min antes de la evaluación conductual. Los animales recibieron dosis crecientes de los fármacos, dejando un periodo de 5 días entre una dosis y la siguiente. Para la valoración de la catalepsia, se empleó una estrecha barra de madera (1 cm ancho) a una altura de 6 cm, sobre la cual se colocaron las patas delanteras del animal, que quedaba apoyado sobre las extremidades traseras. En condiciones normales, los animales tienden a bajar rápidamente. Se registró el tiempo que los ratones permanecieron apoyados en la barra durante un periodo máximo de 3 min.

Paralelamente, se realizaron experimentos en los que se modificó la actividad locomotora mediante la administración de agonistas dopaminérgicos. La actividad fue analizada en la prueba de campo abierto (ver *caracterización conductual*) en condiciones de baja iluminación (50 luxes). 10 min antes de la prueba se administró el agonista selectivo de receptores dopaminérgicos D2, quinpirole (Sigma/RBI, USA, 2 mg/kg disuelto en solución salina 0,9%) por vía intraperitoneal y se analizó la actividad del animal durante 4 min.

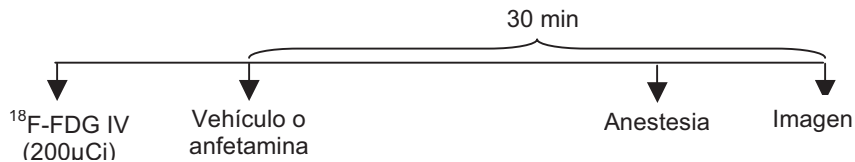
Solamente en el modelo de sobreexpresión de Dyrk1A, se estudió el efecto sobre la actividad provocado por la administración del agonista indirecto anfetamina (cedido por el Dr F. Artigas, IDIBAPS). Durante 15 min se permitió que el ratón se habituara al aparato de campo abierto. Transcurrido ese tiempo se le administró a cada ratón intraperitonealmente la anfetamina (vehículo, 3 o 5 mg/kg en solución salina 0.9%). Se registró la distancia recorrida por el ratón en los 30 min siguientes que duró la prueba. Ningún ratón recibió más de un tratamiento ya que esta prueba genera habituación y los resultados en una segunda exposición al aparato no serían representativos.

5. TÉCNICAS DE IMAGEN *IN VIVO*: MICRO-PET

Las técnicas de imagen molecular *in vivo* son técnicas no invasivas en las que los datos se adquieren de manera reproducible y cuantitativa, permitiendo visualizar procesos fisiológicos celulares y moleculares en seres y tejidos vivos de forma previa e independiente a que se produzca cualquier cambio anatómico. Dentro de la imagen molecular, la tomografía por emisión de positrones (PET, Positron Emission Tomography) es una técnica que permite obtener información metabólica a escala molecular. Para su realización se administran por vía intravenosa isótopos emisores de positrones (como C^{11} , N^{13} , O^{15} ó F^{18}) que remedan la acción de sustratos biológicos incorporándose a sus rutas bioquímicas. La alta especificidad de esta técnica permite monitorizar con exactitud la biodistribución, cinética y efectos metabólicos de los radiotrazadores.

Los experimentos se realizaron en el Instituto de Alta Tecnología (IAT) asociado al Parc de Recerca Biomedica de Barcelona (PRBB) en colaboración con la Dra O. Millán y el Dr J. Gispert mediante la utilización de un microPET R4 (Concorde Microsystems, Knoxville, TN, USA). Se utilizó ^{18}F -FDG como radiotrazador, un compuesto análogo de la glucosa que penetra en las células, y una vez dentro de ellas es fosforilada por la enzima hexoquinasa y queda atrapada, ya que no puede continuar la vía glicolítica ni volver a atravesar la membrana plasmática. En nuestros experimentos, se utilizó este radiotrazador como medida indirecta de la actividad metabólica cerebral, permitiendo analizar las áreas activadas de manera diferencial en nuestros modelos tras ser sometidos a diferentes tratamientos: la administración de la anfetamina o la exposición postnatal al enriquecimiento ambiental. En ambos casos se siguió un protocolo similar, con la diferencia que los ratones del experimento de enriquecimiento sólo fueron expuestos al aparato en una sesión. En el caso del tratamiento con anfetamina, y con objeto de que cada animal constituya su propio control, el primer día los animales fueron tratados con el vehículo (solución salina) administrado por vía intraperitoneal, inmediatamente después de ser inyectados por vía intravenosa con el radiotrazador (^{18}F -FDG). Tras un período de 30 min necesario para la incorporación del radiotrazador, los animales fueron sometidos a la exploración por PET. Tanto durante la inyección del radiotrazador como durante el período de incorporación, los animales permanecieron despiertos. La anestesia (Ketamina/xilacina intraperitoneal en el

caso de los experimentos de administración de anfetamina, e isoflurano inhalado con el experimento de enriquecimiento) se les indujo 5 min antes del inicio de captación de las imágenes PET, y se mantuvo durante los 10 min que duró la adquisición, para evitar el movimiento (ver esquema adjunto). En el caso del estudio de la activación cerebral como respuesta a la anfetamina, el segundo día se repitió el mismo protocolo de adquisición de imágenes, pero con la administración del fármaco (anfetamina intraperitoneal: 4 mg/kg) en lugar del vehículo.



El análisis de las imágenes se llevó a cabo delimitando manualmente una única región de interés (ROI) que abarcara todo el cerebro mediante el programa informático ASIPro (Concorde Microsystems, Knoxville, USA). Sobre dicha región se calculó el *Standard Uptake Value* (SUV), valor normalizado de captación, teniendo en cuenta la actividad en la región de interés con respecto a la dosis total de ^{18}F -FDG administrada y al peso de cada animal. En la representación gráfica se muestra el porcentaje de activación de cada genotipo como respuesta al estímulo de anfetamina o al enriquecimiento ambiental.

6. CULTIVOS PRIMARIOS CORTICALES EN EL MODELO DE SOBREENPRESIÓN DE DYRK1A

Los cultivos primarios se obtuvieron a partir de la corteza cerebral de embriones extraídos en el día 18 de gestación tanto para los experimentos de caracterización de la neuritogénesis como para los estudios de la dinámica de actina.

6.1. Preparación previa del material

El material de cultivo fue tratado con diferentes soluciones en función del tipo de experimento que se realizó. En el estudio de la caracterización de la neuritogénesis, el día anterior al establecimiento del cultivo se sumergieron cubreobjetos redondos

(12 mm de diámetro) en una solución de agua estéril con polietilenimina 4 µg/ml (SIGMA, UK) en una placa de petri estéril que se dejó durante toda la noche en el incubador a 37°C. En el caso de los estudios de la dinámica de la actina se emplearon placas Mattek (Mattek corporation, MA, USA) que facilitan la observación del cultivo con el microscopio confocal. Estas placas se lavaron con ácido nítrico y etanol al 100% y se trataron durante toda la noche con Poli-D-lisina 10 µg/ml. En ambos casos, en el momento de su utilización, se lavaron dos veces con agua estéril y se dejaron secar en el interior de la campana en condiciones de esterilidad. Finalmente, las placas Mattek fueron tratadas con laminina 4 µg/ml.

6.2. Disección de cortezas embrionarias

Las hembras gestantes fueron sacrificadas mediante dislocación cervical y los embriones se extrajeron con ayuda de material quirúrgico previamente esterilizado mediante calor (Germinator, Panlab SA, España). Los embriones se colocaron en una placa de petri estéril y sobre hielo para favorecer su anestesia y muerte gradual como consecuencia de la hipotermia. Tras diseccionar la cabeza del feto, y tomar una biopsia de la cola para su posterior genotipación, se extrajo con cuidado el cerebro del cráneo y se separaron los dos hemisferios. A continuación, se colocaron en una placa de Petri con 2 ml de medio DMEM (Invitrogen, UK) y se retiraron las meninges bajo lupa. En la disección, se disecó primero la zona de los ganglios de la base y posteriormente el hipocampo con ayuda de un bisturí. Las cortezas aisladas se traspasaron a otra placa de Petri con 2 ml de DMEM.

6.3. Establecimiento del cultivo primario cortical

Con ayuda de un bisturí se trocearon las cortezas en pequeños cubos de aproximadamente 1 mm³. El tejido se transfirió a un tubo detallado estéril de 15 ml junto con 2 ml de DMEM, se disgregó mediante un pipeteo suave con pipeta pasteur (30 veces) para obtener una suspensión de células sin agregados y se completó con DMEM hasta un volumen de 5 ml. Tras la centrifugación (5 min a 1000 rpm), se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 200 µl del medio de cultivo (NB⁺⁺). El medio de cultivo consistía en 50 ml de medio

Neurobasal™ (Invitrogen, UK), 1 ml de Supplement B27 (Invitrogen, UK), 0.5 ml de Glutamax (Invitrogen, UK) y 0.25 ml de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, UK). Mediante una cámara de Neuvawer se realizó el conteaje del número de células existentes en suspensión

En los experimentos de caracterización de la neuritogénesis, se diluyó la muestra con NB⁺⁺ hasta una concentración final de células vivas de 2000000 por ml. Sobre los cubreobjetos previamente preparados con polietilimina se colocaron unos anillos de plástico estériles (diámetro interior de 7 mm, altura de 1.3 mm) y se pipetearon sobre cada uno 50 µl de la suspensión celular (concentración final 100000 células por ml). Tras una hora de incubación a 37°C con 5% CO₂, se retiraron los anillos y se traspasó cada uno de los cubreobjetos con el cultivo a un pocillo de placas de 24 pocillos que contenían medio de cultivo NB⁺⁺ previamente calentado a 37°C. Los cultivos se dejaron incubando a 37°C con 5% CO₂ y un alto grado de humedad. A las 24 horas de establecer el cultivo ya podía observarse neuritogénesis en las células vivas.

Los cultivos destinados para el estudio de la dinámica de la actina fueron transfectados antes de ser plaqueados (ver más abajo). Para proceder a la transfección se necesitaba una cantidad total de 2 millones de células. Una vez transfectados se eliminó el sobrenadante, se plaquearon en las cámaras Mattek y se dejaron incubando a 37°C al 5% CO₂. Como la formación de las espinas se produce al menos a los 14 días *in vitro*, el cultivo se mantuvo renovando el medio de cultivo añadiendo 200 µl de medio NB⁺⁺ fresco.

6.4. Transfección de cultivos primarios corticales

El empleo de cultivos primarios es considerado como una de las herramientas más idóneas para el estudio de la neuritogenesis y sinaptogénesis *in vitro*. Con este fin se realizaron transfecciones con un trazador fluorescente GFP generado bajo el promotor neuronal Thy1 que permite visualizar la morfología de las neuronas. Esta construcción fue generada y cedida por Dr G.Ramakers. Brevemente, se transfectaron 0.5 µg de GFP-DNA por cultivo empleando un vehículo lipídico comercial (Lipofectamine 2000, Invitrogen, UK) en las primeras etapas de división DIV1 y se fijaron en DIV3 permitiendo estudiar el crecimiento axonal y dendrítico.

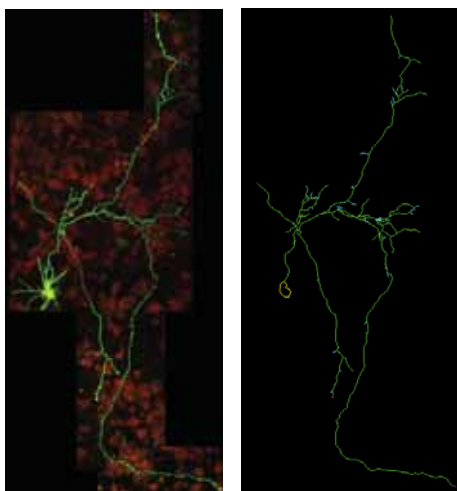
Debido a la baja eficiencia de transfección obtenida en los cultivos maduros (14 DIV), los cultivos destinados al estudio de la actina de las espinas dendríticas se transfectaron con YFP-actina que se incorpora al citoesqueleto (en esta ocasión cedido por el Dr Morales) usando un electroporador y el kit Mouse Nucleofector (Amaxa biosystems, Alemania) siguiendo las instrucciones de uso del fabricante. A pesar de la baja eficiencia de transfección (50%), la supervivencia de los cultivos se incrementaba usando esta metodología. Estos cultivos se mantuvieron hasta 20-22 DIV.

6.5. Immunocitoquímica

Con el fin de facilitar el análisis morfométrico de las neuronas excitatorias, en los cultivos corticales transfectados se realizó una inmunocitoquímica para poner de manifiesto las neuronas inhibitorias o gabérgicas. Esta tinción permitió descartar del estudio de entre las neuronas transfectadas (marcadas con fluorescencia verde) aquellas que eran de carácter inhibitorio (fluorescencia roja).

Los cultivos transfectados fueron lavados 2 veces con PBS estéril durante 10 minutos y posteriormente fijados con una solución de PFA al 4% en PBS. A continuación, se realizaron 3 lavados rápidos con PBS 0.1 M para eliminar cualquier resto de fijador, seguidos de 3 lavados con PBS con tritón al 0.05% (PBS-T). Seguidamente, para bloquear los puntos de unión inespecíficos se trataron los cristales con suero de burro (NDS, normal donkey suerum, Invitrogen, España) al 10% en PBS-T durante 1 h a TA. Seguidamente, los cubreobjetos se incubaron durante toda la noche en una cámara húmeda de 4°C con una solución compuesta por el anticuerpo anti-GABA (dilución 1:200, SIGMA, UK) con NDS al 5% en PBS-T. Al día siguiente se realizaron 6 lavados de 10 min cada uno con PBS-T y en una cámara húmeda se incubaron los cultivos con el anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina de conejo Texa-red (dilución 1:400, Molecular Prof., Invitrogen, UK). Finalmente, el exceso de anticuerpo que no se había unido se eliminó mediante dos lavados de 10 min con PBS-T y otros dos lavados de la misma duración con PBS. Los cubreobjetos se montaron con Mowiol en portaobjetos, con las células entre los dos vidrios, y se guardaron en oscuridad a 4°C quedando listos para su observación bajo el microscopio.

6.6. Análisis morfométrico



El análisis morfométrico se realizó bajo la supervisión del Dr G. Ramakers en el Netherland Institut for Brain Research en Ámsterdam (Holanda). En este centro disponen del programa NeuroDraw de generación propia para la reconstrucción de neuronas fluorescentes. Tras la captura de la imagen en diferentes planos y campos mediante el programa informático específico acoplado a un microscopio de fluorescencia, se dibujó cada neurona

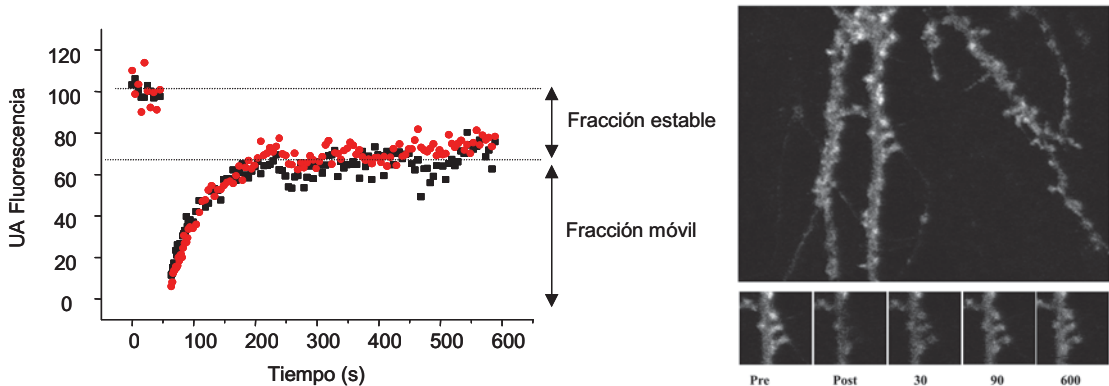
manualmente con la ayuda del programa informático y se analizaron diversos parámetros (ver tabla adjunta. En los cultivos transfectados en estadios tempranos podía existir dificultad para identificar el axón, por lo que el axón fue definido como la neurita más larga de acuerdo con Dotti et al (Dotti et al. 1988).

Parámetro morfométrico	Descripción
Área del soma (μm^2)	Área del núcleo neuronal
Número de ramificaciones	Número de ramales principales emergentes desde el núcleo
Longitud de ramificaciones (μm)	Longitud del sumatorio de todas las ramificaciones
Número de puntos de ramificación	Número de puntos de bifurcación
Número de segmentos terminales	Número de ramificación que se extiende desde el último punto de intersección
Longitud de segmentos terminales (μm)	Longitud media de todas las ramificación que se extiende desde el último punto de intersección
Número de segmentos intermedios	Número de segmentos existentes entre dos puntos de intersección
Longitud de segmentos intermedios (μm)	Longitud media de los segmentos existentes entre dos puntos de intersección
Número de filopodios	Número total de filopodios
Longitud de filopodios (μm)	Longitud media de filopodios
Densidad de filopodios (filopodio/ μm^2)	Densidad de filopodios por ramificación
Distancia radial de ramificación (μm)	Distancia entre soma neuronal y los puntos más distales de las ramificaciones

El análisis del cono de crecimiento se realizó empleando los cultivos transfectados con GFP-actina. Utilizando una lente de 40X (n.a. 1.3) de un microscopio confocal Zeiss 410, se seleccionó de cada neurona transfectada (un total de 50 por grupo) el cono de crecimiento axónico y dendrítico más grande y trazando una circunferencia entorno al cono, se analizó la densidad de conos y el área de éstos.

6.7. Estudios de la dinámica de actina en espinas

Los experimentos fueron realizados con un microscopio confocal LEICA DMIRE2 TCS SL (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Alemania) acoplado a un sistema de incubación con control de la temperatura a 35.5 °C y de CO₂ al 5%. Estos experimentos se diseñaron y realizaron bajo la supervisión del Dr M. Morales y la Dra M. Calvo de la unidad de Servicios Científico-Técnicos del IDIBAPS de Barcelona. La metodología del FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) permite registrar la recuperación de la fluorescencia tras la exposición intensa al láser. En nuestras neuronas transfectadas por GFP-actina, la aplicación de un láser con un haz luminoso de alta intensidad (“photobleaching” o fotoblanqueo) sobre una región de interés elimina su fluorescencia. A medida que transcurre el tiempo se va observando una recuperación de ésta que es debida a la difusión de monómeros de actina desde la dendrita hacia la espina. En este proceso se distingue en los primeros segundos un incremento importante de la fluorescencia debido a la entrada de actina desde la dendrita (fracción móvil) seguida de un proceso estable de pequeñas fluctuaciones en el que se están produciendo interacciones entre las nuevas unidades de actina y los filamentos ya existentes para estabilizar la espina. Se considera como fracción estable la porción de actina que no consigue recuperar la fluorescencia tras el “photobleaching” (ver esquema adjunto).



Las neuronas fueron analizadas usando un objetivo de inmersión de 63X. Una vez seleccionada la espina, se realizaron 10 escáner en intervalos de 1.5 s (“prebleaching” o preblanqueo) y a continuación se aplicó un láser de alta intensidad de 488 nm en un área circular limitada de 2.58 μm^2 (ROI, región de interés) que

cubría la espina de estudio. Se obtuvieron imágenes cada 1.6 s pero con la intensidad del láser atenuada para evitar el desgaste añadido de la fluorescencia. La recuperación de la fluorescencia en la zona de blanqueo fue cuantificada mediante el programa Image Processing Leica Confocal. La fluorescencia de la dendrita fue determinada para cada imagen y comparada con la inicial para determinar la pérdida señal durante la toma de imágenes.

La fluorescencia de la ROI (I_{ROI}) se normalizó en función de los cambios observados en la fluorescencia de la dendrita: $I_{ROI} = T_0 \times I_t / (T_t \times I_0)$, siendo T_0 la intensidad de la dendrita en el preblanqueo, T_t la intensidad de la dendrita a cada tiempo, I_0 intensidad media de la ROI durante el preblanqueo, I_t intensidad media de la ROI a cada tiempo.

Para determinar la fracción móvil (F_m) presente en la espina se aplicó la fórmula:

$F_m = F_{eq} - F_{post} / F_{pre} - F_{post}$ siendo, F_{eq} la intensidad media de la ROI cuando se alcanza el equilibrio (100-200 s), F_{post} intensidad de la ROI tras el fotoblanqueo y F_{pre} intensidad de la ROI en el preblanqueo. Se representa como el porcentaje de fracción móvil de actina.

Para determinar la vida media de recuperación de la fluorescencia se eliminaron los datos del preblanqueo y ajustó la curva a la ecuación de regresión no lineal aplicando el programa estadístico Graphpad.

7. ESTUDIOS DE ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL EN EL MODELO DE SOBREENPRESIÓN DE DYRK1A



El enriquecimiento ambiental permite incrementar las posibilidades de estimulación y/o interacción física y social, durante la estabulación de los animales, cambios que se han asociado con modificaciones en la plasticidad sináptica.

Las camadas empleadas en estos experimentos se mantuvieron con sus madres hasta el día del destete (día 22 postnatal), momento en que se inició el tratamiento de enriquecimiento. Los animales fueron estabulados en jaulas amplias con varios pisos (40 x50 x20 cm), en grupos grandes de 7-8 animales que favorecían las oportunidades de interacción social. Con un intervalo de tres días se fueron introduciendo objetos (cajas, ruedas, túneles, casas, juguetes, tubos, papel, etc)

que se van intercambiando con otros periódicamente, lo cual permite la interacción social y física con estímulos no sociales. Además se introdujeron variaciones en la alimentación, incluyendo alimentos nuevos, diferentes del pienso estándar. Por el contrario, los animales no sometidos a enriquecimiento ambiental son estabulados en las condiciones estándar en grupos no superiores a 3 animales por jaula. El enriquecimiento se prolongó durante 4 semanas tras las cuales todos los animales (enriquecidos y no enriquecidos) fueron sometidos a diversas pruebas de conducta (ver *Caracterización conductual*). Mediante la tabla de agujeros se determinó los cambios en actividad exploratoria. Las modificaciones en aprendizaje y memoria visuo-espacial fueron analizadas usando el laberinto acuático de Morris (MWM) mientras que la memoria reciente fue estudiada en la prueba de evitación pasiva. Al finalizar la batería de pruebas conductuales, los animales fueron sometidos a técnicas de imagen in vivo (ver *Técnicas de imagen in vivo: micro-PET*) para visualizar los cambios en actividad metabólica debidos a este tratamiento no farmacológico.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con la ayuda de los diferentes paquetes informáticos estadísticos SPSS y R. Para establecer las diferencias significativas se aplicó ANOVA de una vía o el análisis multivariable de la varianza (MANOVA) usando el test de Bonferroni test como análisis *post hoc*. El análisis de medidas repetidas ANOVA fue empleado en la comparación de las curvas de dos grupos. En los casos en los que existe un desequilibrio importante de los datos se empleó un modelo mixto lineal para estimar el efecto del genotipo sobre las variables dependientes. Finalmente, cuando existía una elevada heterogeneidad en los datos se aplicó el test no paramétrico de U-Mann Whitney. La correlación entre dos mediadas fue anlizada mediante el test de Pearson.

RESULTADOS



La primera fase experimental de esta Tesis Doctoral se ha dirigido a establecer el impacto funcional de modificaciones de dosis de *Dyrk1A* sobre el proceso neurodegenerativo asociado al envejecimiento. Hemos establecido las alteraciones del fenotipo conductual en dos modelos con niveles de expresión diferentes: el modelo de haploinsuficiencia (*Dyrk1A* +/-) y un modelo de sobreexpresión (*TgDyrk1A*). Ambos modelos fueron generados por investigadores del Programa Genes y Enfermedad del CRG (ver Métodos). Los estudios realizados en el modelo de haploinsuficiencia nos permitirán determinar las funciones fisiológicas que requieren la presencia de dos copias de *Dyrk1A* y por tanto podrán predecir en cierta medida aquellos dominios funcionales potencialmente alterables por su sobreexpresión. Por ello en primer lugar se ha caracterizado el modelo de haploinsuficiencia *Dyrk1A* +/-.

1. ALTERACIONES NEUROLÓGICAS Y COMPORTAMENTALES ASOCIADAS A LA EDAD EN UN MODELO MURINO DE HAPLOINSUFICIENCIA DE *DYRK1A* (*DYRK1A*+/-).

1.1. El ratón *Dyrk1A*+/- presentó alteraciones en la fuerza muscular y la marcha que se acentuaron con el envejecimiento

1.1.1. Curva de supervivencia en el ratón *Dyrk1A*+/-

Con el objetivo de establecer el efecto en la supervivencia producido por la carencia parcial del gen *Dyrk1A*, se registró a lo largo de 2 años el número de animales vivos de la colonia de ratones *Dyrk1A*+/. No se observaron diferencias significativas en la supervivencia entre ambos genotipos, expresada como porcentaje de animales vivos a lo largo del tiempo (efecto de genotipo, $P = 0.46$, ANOVA de medidas repetidas). En la Figura 1 se ha representado únicamente la fase final de la curva, ya que en edades más jóvenes las curvas de ambos genotipos se solapan.

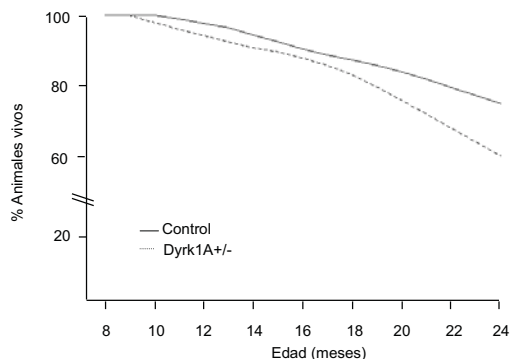


Figura 1. Curva de supervivencia en los ratones Dyrk1A+/-. Estudio de la supervivencia del modelo de haploinsuficiencia de Dyrk1A desde los 8 a los 24 meses de edad. (Control n = 25; Dyrk1A+/- n = 20). Los datos se expresan como media ± E.E.M.

1.1.2. Deterioro neurológico en el ratón Dyrk1A+/- con el envejecimiento

Se realizó la evaluación neurológica de los animales mediante la batería de pruebas del protocolo SHIRPA en dos cortes transversales de edad. En la tabla adjunta (tabla 1) se muestran los valores obtenidos para cada genotipo y edad en las diferentes pruebas.

En animales adultos no se observaron diferencias entre genotipos a excepción de la respuesta de sobresalto en la que los ratones Dyrk1A+/- muestran una respuesta significativamente menos acentuada (efecto de genotipo, $P < 0.001$, ANOVA). En los animales viejos se observó un deterioro general de las capacidades neurosensoriales característico del envejecimiento sin que se apreciaran diferencias entre ambos genotipos. Las alteraciones mostraban el patrón típico de envejecimiento para las cepas de origen descrito en la literatura, afectando al sistema vestibular (prueba de enderezamiento y geotaxia negativa), la capacidad visual, la nocicepción (pinzamiento de pata) y la respuesta de sobresalto.

Tabla 1. Evaluación neurosensorial en Dyrk1A+/-

	Adulto (6 meses)		Viejo (20 meses)	
	Control	Dyrk1A +/-	Control	Dyrk1A +/-
Enroscamiento	0.04 ± 0.03	0.04 ± 0.04	0.33 ± 0.07	0.34 ± 0.07
Capacidad visual	2.64 ± 0.08	2.42 ± 0.14	1.86 ± 0.78	1.56 ± 0.12
Reflejo de retracción del pabellón auricular	0.95 ± 0.04	1.00 ± 0.00	1.28 ± 0.01	1.18 ± 0.10
Reflejo corneal	0.95 ± 0.04	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Pinzamiento de pata	2.10 ± 0.10	1.92 ± 0.19	1.43 ± 0.11	1.50 ± 0.12
Reflejo de enderezamiento	0.09 ± 0.06	0.28 ± 0.14	0.08 ± 0.08	0.37 ± 0.12
Geotaxia negativa	0.39 ± 0.09	0.58 ± 0.25	1.38 ± 0.12	1.31 ± 0.13
Respuesta de sobresalto	196 ± 0.04	1.33 ± 0.23	0.52 ± 0.11	0.56 ± 0.12

Evaluación neurológica y sensoriomotora mediante la aplicación del protocolo SHIRPA en ratones Dyrk1A +/- en diferentes edades (control adulto n = 24; Dyrk1A +/- adulto n = 12; control viejo n = 21; Dyrk1A +/- viejo n = 16). Los datos se expresan como media ± E.E.M. Diferencias entre genotipos *** $P < 0.001$; diferencias entre edades en un mismo genotipo §§ $P < 0.01$, §§§ $P < 0.001$.

1.1.3. Actividad locomotora en el ratón Dyrk1A+/-

En el primer trabajo referido al modelo de haploinsuficiencia se describió un claro fenotipo motor caracterizado por hipoactividad que se mostraba sobre todo en entornos experimentales aversivos (Fotaki et al. 2002). Por tanto, y dado que la actividad motora es una de las funciones fisiológicas que más se modifica con el envejecimiento era necesario evaluar ésta en los animales viejos. Se analizó la actividad locomotora durante 72 horas en un entorno no aversivo mediante la rueda de actividad en animales viejos de ambos genotipos. Los animales Dyrk1A+/- mostraron un nivel de actividad sustancialmente menor que sus respectivos controles (efecto de genotipo, $P = 0.003$, ANOVA de medidas repetidas) (Figura 2A), indicando una actividad basal reducida en un ambiente poco estresante, similar a lo previamente descrito en los animales jóvenes (Fotaki et al. 2002). Mas aún, las diferencias entre ambos genotipos se incrementaron durante la fase oscura del ciclo luz-oscuridad, fase en la que la actividad espontánea resulta más relevante (efecto de genotipo, $P < 0.001$, ANOVA) (Figura 2B).

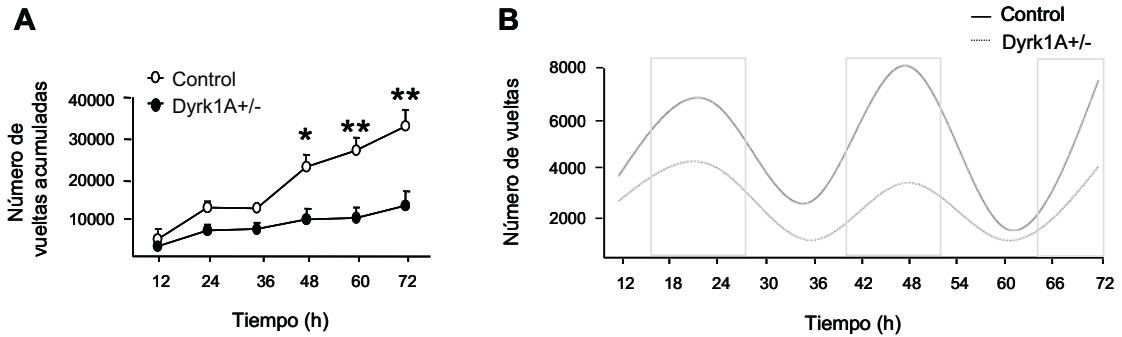


Figura 2. Actividad motora de animales Dyrk1A+/- viejos. Se representa A) los valores acumulativos y B) el número de vueltas realizadas por ratones de 20 meses de edad durante 72 horas de estabulación en jaulas acopladas a una rueda de actividad (control n = 11; Dyrk1A+/- n = 12). La zona encuadrada se corresponde con la fase oscura del ciclo luz-oscuridad. Los datos se expresan como media \pm E.E.M. Diferencias entre genotipos * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

1.1.4. Cambios sensoriomotores en el ratón Dyrk1A+/- asociados a la edad

Evaluación de la marcha en el ratón Dyrk1A+/-

Mediante la prueba de la impronta de pisadas se observó que los ratones Dyrk1A+/- adultos presentaban un número de pasos significativamente mayor (efecto de genotipo, $P < 0.001$, ANOVA) que sus respectivos controles y con una menor distancia medida entre huellas (efecto de genotipo, $P < 0.001$, ANOVA) (Figura 3A y 3B). El ratón Dyrk1A+/- viejo continuó realizando pasos más cortos en comparación con sus homólogos control, si bien las diferencias no fueron tan significativas como en el adulto (efecto de genotipo, número de pasos: $P < 0.05$, ANOVA; distancia entre pasos: $P < 0.05$, ANOVA). Los ratones Dyrk1A+/- no mostraron diferencias en el patrón de marcha, mientras que en los ratones control se observó una significativa reducción en la marcha caracterizada por la realización de pasos más cortos (efecto de edad, $P < 0.05$, ANOVA) con el envejecimiento (Figura 3A).

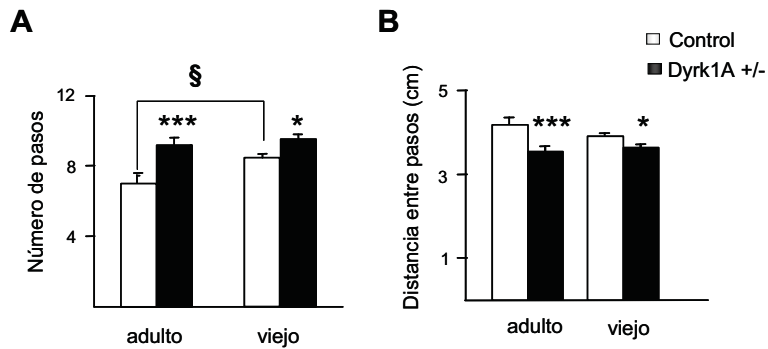


Figura 3. Análisis del patrón de marcha en ratones Dyrk1A +/-. Se muestran los resultados del análisis de la impronta de las pisadas realizada por los ratones en dos cortes de edad. Se representan (A) el número de pisadas realizadas y (B) la distancia entre los pasos de los animales Dyrk1A +/- y sus respectivos controles (control adulto n = 7; Dyrk1A +/- adulto n = 7; control viejo n = 20; Dyrk1A +/- viejo n = 14). Los datos se expresan como media \pm E.E.M. Diferencias entre genotipos * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; diferencias entre edades en un mismo genotipo § $P < 0.05$.

Deterioro del equilibrio con el envejecimiento en el ratón Dyrk1A +/-

En la prueba de equilibrio no se observaron diferencias entre genotipos en los dos cortes de edad estudiados. Sin embargo, durante la primera sesión de la prueba, en la que el animal tiene el primer contacto con la barra y por lo tanto sería la que tiene un menor componente de aprendizaje y representa mejor la variable “equilibrio”, se observó una peor ejecución en ambos genotipos con el envejecimiento, si bien la diferencia solamente alcanzó significación estadística en los ratones Dyrk1A +/- viejos (efecto de genotipo, $P < 0.05$, ANOVA). En la segunda sesión, se observó de nuevo un efecto edad-dependiente en ambos genotipos, si bien los ratones control viejos mejoraron la ejecución alcanzando una puntuación similar a la correspondiente a la etapa adulta, mientras que los ratones Dyrk1A +/- no lograron realizar la prueba como en la edad adulta aunque la diferencia no alcanzó significación estadística (Figura 4).

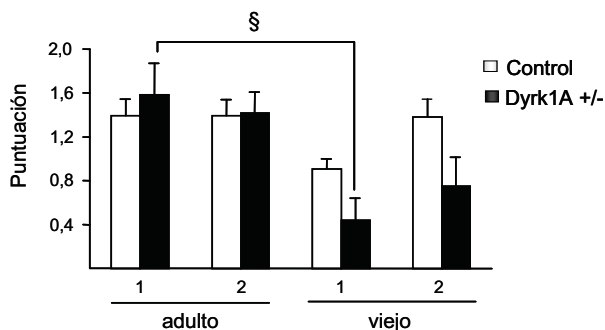


Figura 4. Efectos de edad en la prueba de equilibrio en ratones Dyrk1A +/-. Se representa la ejecución de la prueba de la barra de equilibrio en los genotipos de estudio a diferentes edades (control adulto n = 23; Dyrk1A +/- adulto n = 12; control viejo n = 21; Dyrk1A +/- viejo n = 16). Los datos se expresan como media \pm E.E.M. Diferencias entre edades en un mismo genotipo § $P < 0.05$.

Efecto de la edad sobre la fuerza muscular en el ratón *Dyrk1A*+/-

La fuerza muscular sufre un claro deterioro con el envejecimiento en los roedores (Delbono 2003), que fue evaluada en nuestros experimentos empleando la medición de la capacidad de tracción en la prueba de la percha y la medida directa de fuerza mediante la utilización de un dinamómetro en la prueba de fuerza de agarre. En la prueba de la percha (Figura 5A), los ratones *Dyrk1A*+/- adultos mostraron un reflejo prensil y fuerza de agarre similares al genotipo salvaje, alcanzando los valores de latencia máxima (5s). Sin embargo, con el envejecimiento, mientras los ratones control continuaban realizando la prueba sin dificultad, en los animales *Dyrk1A*+/- se apreció un importante empeoramiento, tanto con respecto a sus controles (efecto de genotipo, $P < 0.001$, ANOVA) como a la ejecución durante la etapa adulta (efecto de edad, $P < 0.001$, ANOVA).

Para analizar con más precisión este parámetro y su deterioro con la edad, se empleó un dinamómetro para la medición automatizada de la fuerza de agarre (Figura 5B). En los ratones adultos se observaron diferencias entre genotipos en el ensayo que utiliza la gravedad como fuerza de tracción (ensayo vertical) (efecto de genotipo, $P < 0.05$, ANOVA), no hallándose diferencias cuando la fuerza de tracción horizontal es ejercida por el experimentador (ensayo horizontal). En los animales viejos, las diferencias entre genotipos se incrementaron, mostrando los animales *Dyrk1A*+/- menor fuerza que sus respectivos controles (efecto de genotipo, $P < 0.001$, ANOVA). Debido a las importantes diferencias de peso existentes entre ambos genotipos, que podrían influir en la ejecución de la prueba, los datos obtenidos se corrigieron con respecto al peso, sin que se hallara interacción entre ambos factores.

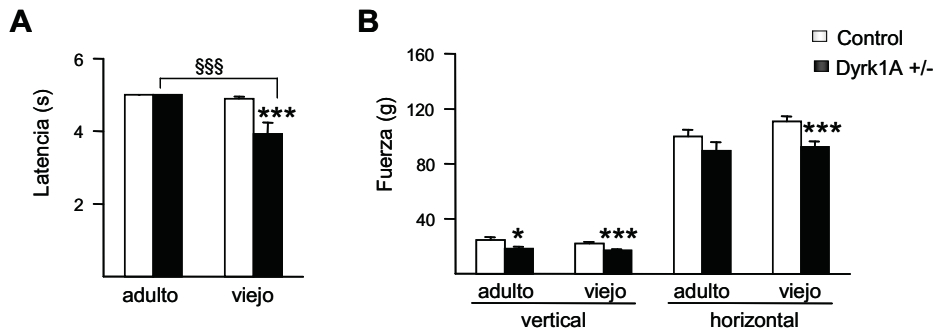


Figura 5. Efecto de la edad sobre la fuerza muscular en ratones Dyrk1A+/-. Se muestra la fuerza muscular en los dos cortes de edad estudiados (control adulto n = 23; Dyrk1A +/- adulto n = 12; control viejo n = 21; Dyrk1A +/- viejo n = 16). A) Representación del tiempo que los animales permanecen aferrados a la percha (latencia máxima: 5s). B) Análisis de la fuerza muscular medida mediante dinamómetro. Los datos se expresan como media \pm E.E.M. Diferencias entre edades en un mismo genotipo §§§ $P < 0.001$.

Alteraciones en la coordinación y el aprendizaje motor en el ratón

Dyrk1A+/- con la edad

El deterioro asociado a la edad de la coordinación motora se analizó mediante las pruebas de la percha y el rodillo giratorio. En el adulto, la latencia de caída fue significativamente menor en los ratones Dyrk1A+/- respecto a sus controles (efecto de genotipo, $P < 0.01$, ANOVA), aunque este parámetro es más indicativo de fuerza o tono muscular. Sin embargo, la latencia de llegada, que se calcula a partir únicamente de los animales que consiguen alcanzar el extremo de la percha, fue similar en ambos genotipos (Figura 6A) sin diferencias en el número de desplazamientos realizados (Figura 6B). Con el envejecimiento se observó un empeoramiento en la ejecución de la prueba en ambos genotipos. Así, la latencia de llegada se incrementó hasta el punto de que muy pocos animales de ambos genotipos alcanzaron el extremo de la percha (efecto de edad, $P < 0.001$, ANOVA) (Figura 6A). Este empeoramiento en la ejecución de la tarea se apreció a su vez en la disminución del número de desplazamientos realizados en ambos genotipos (efecto de edad, $P < 0.01$, ANOVA) (Figura 6B). En los animales viejos las diferencias en el número de desplazamientos entre genotipos resultaron significativas (efecto de genotipo, $P < 0.05$, ANOVA), indicando una reducción de la actividad sobre la percha que depende de la integración de la coordinación motora más acusada en Dyrk1A+/- . En cuanto a la latencia de caída, las diferencias ya existentes en la época adulta se acentuaron durante el envejecimiento (efecto de

genotipo, $P < 0.001$, ANOVA), aunque se observó un detrimento en ambos genotipos (efecto de edad, $P < 0.001$, ANOVA) (Figura 6A).

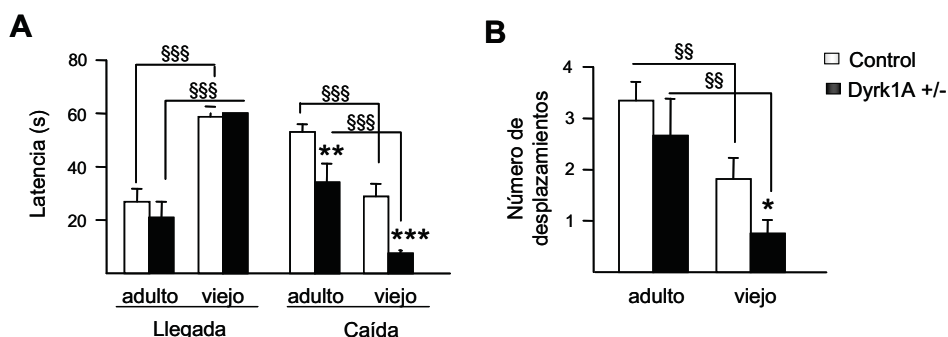


Figura 6. Análisis de los cambios en coordinación motora asociados al envejecimiento mediante la prueba de la percha en ratones Dyrk1A+/-. (A) Representación de la latencia de caída y llegada al extremo de la percha y (B) del número de desplazamientos realizados durante 60 segundos en los genotipos estudiados (control adulto $n = 23$; Dyrk1A +/- adulto $n = 12$; control viejo $n = 21$; Dyrk1A +/- viejo $n = 16$). Los datos se expresan como media \pm E.E.M. Diferencias entre genotipos $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; diferencias entre edades en un mismo genotipo $\$P < 0.01$, $\$\$P < 0.001$.

La coordinación motora fue también evaluada mediante la prueba del rodillo giratorio (Rotarod). En ratones adultos de ambos genotipos la curva de coordinación motora, expresada como la latencia de caída a velocidades crecientes constantes, fue similar indicando que no existe afectación dependiente de genotipo a este nivel (efecto de genotipo, $P = 0.31$ ANOVA de medidas repetidas) (Figura 7). Lo mismo ocurre en los animales viejos (efecto de genotipo, $P = 0.48$ ANOVA de medidas repetidas). Cuando se evaluó el efecto de la edad no se observaron diferencias importantes sugiriendo la conservación de este parámetro en ambos genotipos (efecto de edad, control $P = 0.29$; Dyrk1A +/- $P = 0.54$ ANOVA de medidas repetidas).

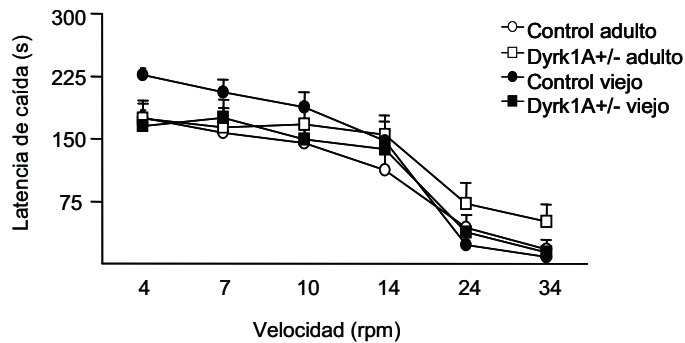


Figura 7. Efecto de la edad en la coordinación motora analizada en el rodillo giratorio en los ratones Dyrk1A+/-. Representación de la latencia de caída en las diferentes sesiones con velocidades constantes distintas (4, 7, 10, 14, 24 y 34 rpm) en los genotipos de estudio a edades diferentes (control adulto n = 22; Dyrk1A+/- adulto n = 17; control viejo n = 16; Dyrk1A +/- viejo n = 14). Los datos se expresan como media \pm E.E.M.

La prueba del rotarod se utiliza también para detectar alteraciones en el aprendizaje motor, mediante un paradigma experimental de sesiones repetidas. El análisis del número de sesiones necesarias para llegar al criterio (mantenerse sobre el rodillo durante 180 segundos) no mostró diferencias entre genotipos en la edad adulta (efecto de genotipo, $P = 0.76$, ANOVA). Sin embargo, en los animales de 22 meses aparecía una tendencia a un peor aprendizaje en los animales Dyrk1A+/- si bien este efecto no alcanzaba significación estadística, en comparación con sus respectivos controles (efecto de genotipo, $P = 0.12$ ANOVA) (Figura 8).

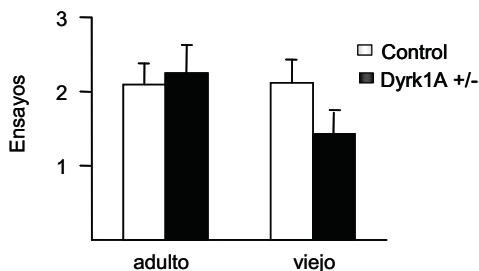


Figura 8. Efecto de la edad en el aprendizaje motor en animales Dyrk1A+/-. Representación del número de sesiones requeridas para que los animales se matengan en equilibrio durante 180 segundos sobre el rodillo girando a la velocidad mínima (4 rpm) en ambos genotipos a dos edades diferentes (control adulto n = 22; Dyrk1A +/- adulto n = 17; control viejo n = 17; Dyrk1A +/- viejo n = 14). Los datos se expresan como media \pm E.E.M.

1.2. El modelo de haploinsuficiencia de Dyrk1A presentó alteraciones en el sistema dopaminérgico nigroestriatal

1.2.1. Análisis estereológico de los núcleos dopaminérgicos en el ratón Dyrk1A+/-

El análisis estereológico de las células TH-positivas de la sustancia negra pars compacta (SNpc) reveló una importante reducción del volumen de este núcleo en los animales Dyrk1A+/- con respecto a los animales control (efecto de genotipo, $P < 0.001$, ANOVA) (Figura 9A). La densidad de neuronas TH-positivas presentes en SNpc en los animales Dyrk1A+/- fue significativamente mayor que en los controles (18.4%; efecto de genotipo, $P < 0.01$, ANOVA) (Figura 9B), mientras que no se apreciaron diferencias en la densidad celular total (Figura 9C). Sin embargo, el cálculo del número total de células TH-positivas se observó una disminución muy significativa en los ratones con haploinsuficiencia de Dyrk1A (32.9%; efecto de genotipo, $P < 0.001$, ANOVA) (Figura 9D) que se acompañaba con una ligera disminución en el número total de células no TH-positivas (efecto de genotipo, $P < 0.05$, ANOVA) (Figura 9E), posiblemente relacionada con la reducción de volumen observada.

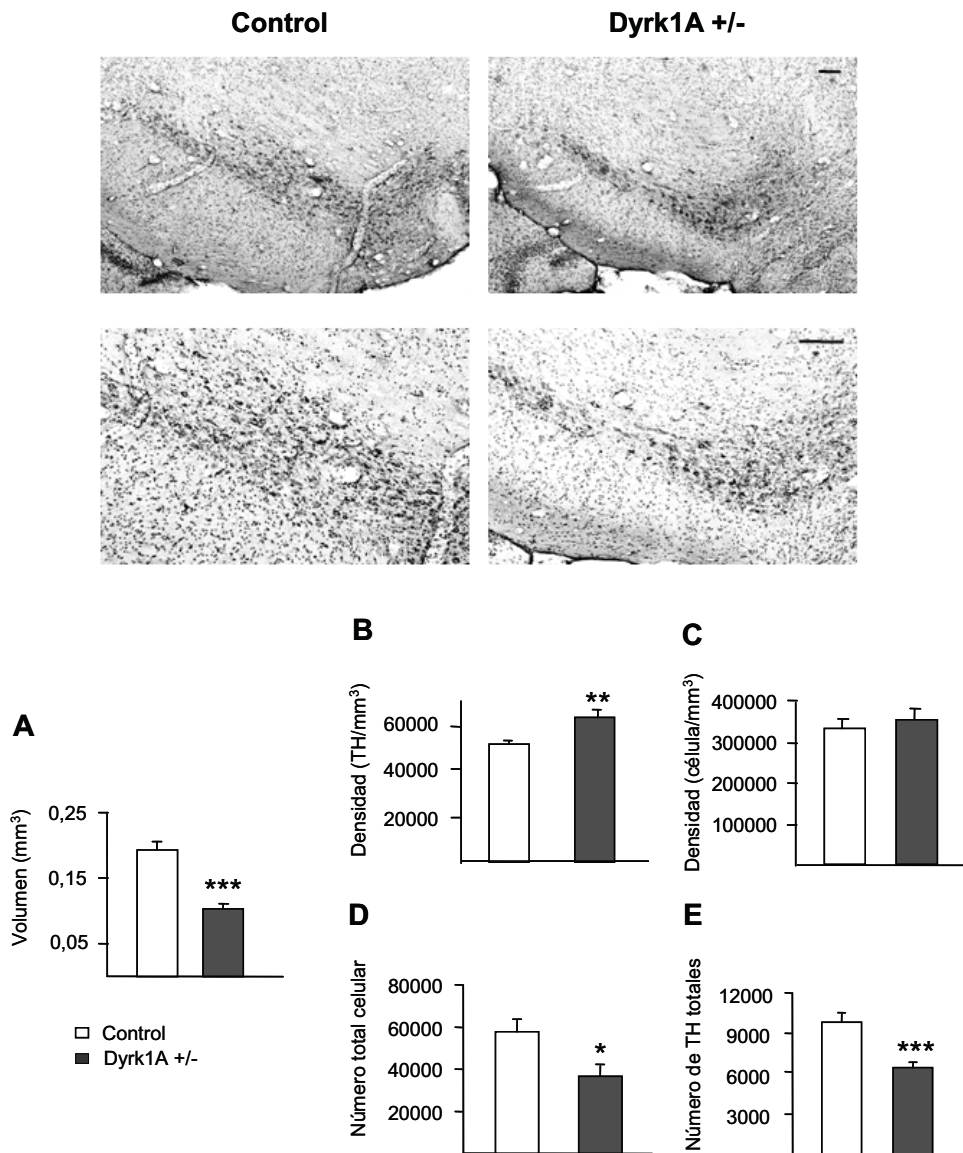


Figura 9. Análisis estereológico de la sustancia nigra pars compacta en Dyrk1A +/-. El panel superior muestra secciones coronales representativas (50 μ m) de la SNPc de ambos genotipos tras la tinción con anticuerpo anti-tirosina hidroxilasa (escala de la barra = 100 μ M). En el panel inferior, representación del A) volumen de este núcleo, B) la densidad de células TH positivas, C) la densidad total celular, D) el número total de células TH positivas y E) la celularidad total. Los datos se expresan como media \pm E.E.M. (n= 4-6 ratones por genotipo). Diferencias entre genotipos * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Con el fin de determinar la integridad histológica del sistema nigroestriatal, se estudio la celularidad del estriado, observándose en el ratón *Dyrk1A*^{+/-} una reducción significativa del volumen (efecto de genotipo, $P < 0.001$, ANOVA) y una importante reducción en el número total de células comparado con sus respectivos controles (efecto de genotipo, $P < 0.001$, ANOVA), a pesar de no hallarse diferencias en densidad celular.

Finalmente, el estudio estereológico del área tegmental ventral (VTA) nuevamente mostró una tendencia a la reducción de volumen en el animal heterocigoto, que no llegó a alcanzar la significación (efecto de genotipo, $P = 0.11$, ANOVA). Aunque no se observaron diferencias en densidad, se detectó una reducción tanto en el número de neuronas TH-positivas (efecto de genotipo, $P < 0.05$, ANOVA) como en el número total de células (efecto de genotipo, $P < 0.05$, ANOVA).

1.2.2. Inducción de catalepsia tras la administración de antagonistas dopaminérgicos en el ratón *Dyrk1A*^{+/-}

En un primer experimento se caracterizó la respuesta a diferentes dosis de bloqueantes de receptores dopaminérgicos (D1 y D2) en ratones de 22 meses, analizando el efecto de catalepsia provocado por su administración. El antagonista D1, SCH-23390 produjo una respuesta cataléptica dosis dependiente (efecto de dosis, $P < 0.001$, MANOVA) más reducida en el ratón *Dyrk1A*^{+/-}, aunque la diferencia entre genotipos no alcanzaba a ser significativa, (efecto de interacción $P = 0.06$, MANOVA), excepto a la dosis de 1 mg/kg (efecto de genotipo $P < 0.05$, posthoc Bonferroni) (Figura 10A).

La administración de un antagonista de los receptores D2 (haloperidol) dio lugar a un patrón de respuesta similar. Mientras los animales control mostraban un importante efecto cataléptico dosis-dependiente, (efecto de dosis, $P < 0.001$, MANOVA), los animales *Dyrk1A*^{+/-} no presentaban incremento del tiempo de catalepsia siendo la diferencia significativa (efecto de interacción, $P = 0.002$, MANOVA). En el análisis de cada dosis se observaron diferencias entre ambos genotipos a las dosis de 1, 2 y 4 mg/kg ($P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.001$ respectivamente, posthoc Bonferroni) (Figura 10B).

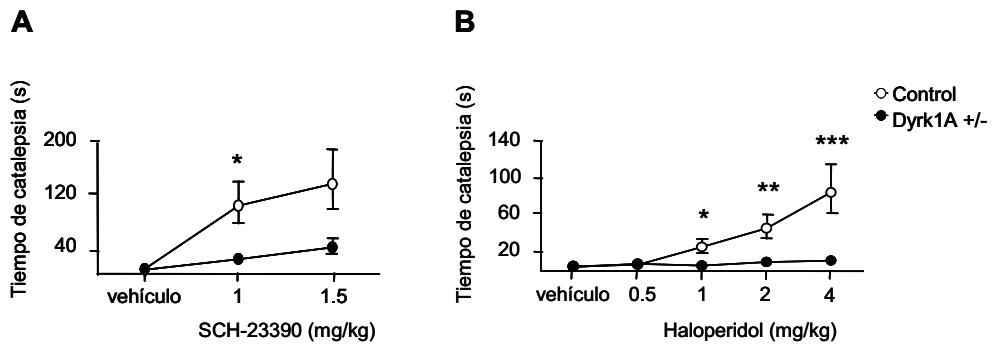


Figura 10. Efecto cataléptico producido por antagonistas dopaminérgicos en Dyrk1A+/-. Tras la administración de dosis crecientes de un antagonista de los A) receptores D1 (SCH-23390) y B) receptores D2 (haloperidol), se evalúa el tiempo de catalepsia en la prueba de la barra en el modelo de haploinsuficiencia de Dyrk1A (controles $n=10$, Dyrk1A+/- $n=9$). Los datos se expresan como media \pm E.E.M. Diferencias entre genotipos * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

1.2.3. Efecto de agonistas dopaminérgicos sobre la actividad en el ratón Dyrk1A+/-

La administración de dosis bajas de quinpirole (2 mg/kg), un agonista dopaminérgico selectivo de receptores D2, produjo una reducción de la locomoción en el campo abierto en ambos genotipos (efecto de tratamiento, $P < 0.001$ ANOVA). Sin embargo, el efecto del fármaco fue significativamente más marcado en los animales control que en los ratones Dyrk1A+/- (efecto de genotipo, $P = 0.002$, ANOVA) indicando una menor sensibilidad al fármaco en el animal heterocigoto (Figura 11).

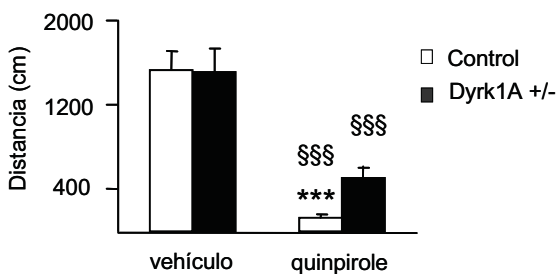


Figura 11. Evaluación de la actividad tras la administración de agonista dopaminérgico D2 en Dyrk1A+/-. Disminución de la distancia recorrida en el campo abierto durante 4 min, tras la administración del agonista D2 quinpirole (2 mg/kg) (controles $n=10$, Dyrk1A+/- $n=9$). Datos se expresan como media \pm E.E.M. Diferencias entre genotipos *** $P < 0.001$, diferencias respecto al grupo salino §§§ $P < 0.001$.

1.2.4. Experimentos de imagen in vivo en el ratón *Dyrk1A*^{+/-} tras la administración de un agonista dopaminérgico indirecto

Los experimentos de imagen in vivo (Dra. O. Millán, IAT) mostraron que la administración intraperitoneal de anfetamina (4 mg/kg) producía un incremento en la actividad metabólica cerebral en ambos genotipos (efecto de fármaco, $P < 0.005$, MANOVA) ya que la captación cerebral de FDG18 se incrementaba notablemente. Este incremento de actividad metabólica era significativamente menor en los animales *Dyrk1A*^{+/-} (interacción genotipo-tratamiento $P = 0.018$, ANOVA de dos vías), siendo del 100% en control y del 28% en *Dyrk1A*^{+/-} (Figura 12).

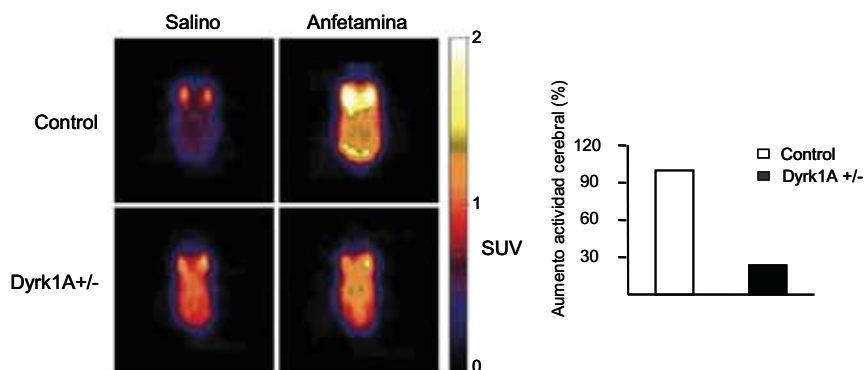


Figura 12. Detección de la actividad metabólica cerebral mediante imagen in vivo de micro-PET. En el panel se muestran secciones transversales representativas de cada genotipo tras la administración IP del vehículo o anfetamina (4 mg/kg). El gráfico se corresponde con el porcentaje de incremento de actividad cerebral observado tras la administración de anfetamina en ambos genotipos.

2. ALTERACIONES NEUROLÓGICAS Y COMPORTAMENTALES ASOCIADAS A LA EDAD EN UN MODELO MURINO DE SOBREEXPRESIÓN DE DYRK1A (TGDYRK1A)

2.1. El ratón TgDyrk1A presentó alteraciones en coordinación motora y una desorganización de los patrones motores

2.1.1. Curva de supervivencia en el ratón TgDyrk1A

La sobreexpresión de Dyrk1A no afecta a la supervivencia de los animales. El registro de la supervivencia de animales control y TgDyrk1A no mostró diferencias entre ambos genotipos (efecto de genotipo, $P = 0.80$, ANOVA de medidas repetidas) (Figura 13).

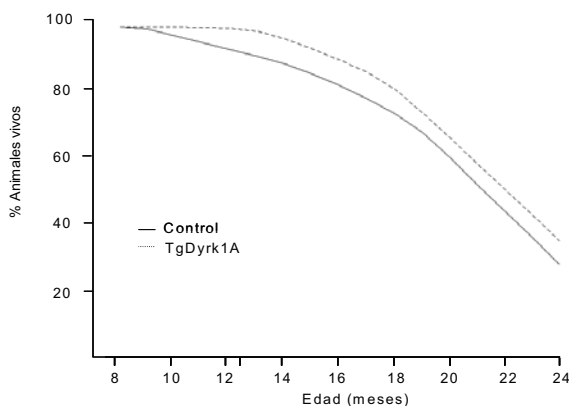


Figura 13. Curva de supervivencia en los ratones TgDyrk1A. Estudio de la supervivencia del modelo de sobreexpresión de Dyrk1A hasta los 2 años de edad (control $n = 17$; TgDyrk1A $n = 16$). Los datos están expresados como media \pm E.E.M.

2.1.2. Deterioro neurológico en el ratón TgDyrk1A con el envejecimiento

La evaluación neurológica de ratones TgDyrk1A se realizó mediante la batería de pruebas SHIRPA en dos cortes transversales de edad (6 y 22 meses). En la tabla adjunta (Tabla 2) se muestran los valores obtenidos para cada genotipo y edad en las diferentes pruebas.

Los ratones TgDyrk1A adultos sólo presentaron alteraciones en la respuesta de escape con respecto a los controles de la misma edad. La reactividad a la estimulación táctil en el ratón TgDyrk1A fue menor ya que presentó una reacción de

escape reducida en comparación con los controles (efecto de genotipo, $P < 0.05$, ANOVA). En el envejecimiento esta tendencia se mantuvo aunque no alcanzó la significación estadística (efecto de genotipo, $P = 0.10$, ANOVA). En cualquier caso, la reacción de escape se encontraba ligeramente incrementada en ambos genotipos con la edad (efecto de edad, $P < 0.05$, ANOVA).

Con el envejecimiento se observó en los animales control un deterioro del sistema vestibular, como se reflejaba en la prueba de enroscamiento (efecto de edad, $P < 0.01$, ANOVA), que no fue apreciable en los ratones TgDyrk1A. Generalmente, el envejecimiento provoca cambios en el pelo del animal que se muestra más inhiesto, alteración presente en los ratones TgDyrk1A (efecto de edad, $P < 0.05$, ANOVA). Finalmente, la respuesta de sobresalto apareció afectada de manera similar con el envejecimiento, siendo significativamente menor en los animales TgDyrk1A (efecto de edad, $P < 0.05$, ANOVA).

Tabla 2. Caracterización neurosensorial de TgDyrk1A

	Adulto (8 meses)		Viejo (22 meses)	
	Control	TgDyrk1A	Control	TgDyrk1A
Enroscamiento	0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.05	0.22 ± 0.09	§§ 0.20 ± 0.06
Capacidad visual	1.67 ± 0.14	1.80 ± 0.13	1.78 ± 0.15	1.55 ± 0.10
Respuesta de alcance	2.25 ± 0.13	2.20 ± 0.13	2.44 ± 0.24	2.20 ± 0.17
Reflejo de retirada del pabellón auricular	1.00 ± 0.00	1.15 ± 0.11	1.28 ± 0.15	§ 1.25 ± 0.85
Reflejo corneal	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Respuesta de escape	1.62 ± 0.15	1.15 ± 0.18 *	2.11 ± 0.11	§ 1.75 ± 0.13 §
Reflejo de retirada de pata	1.50 ± 0.21	1.55 ± 0.17	1.88 ± 0.21	1.88 ± 0.12
Reflejo de enderezamiento	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.11 ± 0.11	0.08 ± 0.06
Geotaxia negativa	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.11 ± 0.11	0.10 ± 0.07
Respuesta de sobresalto	1.29 ± 0.16	1.30 ± 0.17	1.11 ± 0.18	0.85 ± 0.08 §
Piloerección	0.08 ± 0.06	0.15 ± 0.07	0.28 ± 0.12	0.45 ± 0.09 §
Posición de la cola	1.21 ± 0.07	1.25 ± 0.13	1.22 ± 0.15	0.90 ± 0.12

Evaluación neurológica y sensoriomotora mediante la aplicación del protocolo SHIRPA en ratones control y TgDyrk1A y en diferentes edades (control adulto n = 12; TgDyrk1A adulto n = 10; control viejo n = 9; TgDyrk1A viejo n = 20). Los datos se expresan como media ± E.E.M. Diferencias entre genotipos * $P < 0.05$; diferencias entre edades en un mismo genotipo § $P < 0.05$ §§ $P < 0.01$.

2.1.3. Cambios de la actividad locomotora y en ansiedad en el ratón TgDyrk1A con la edad

La actividad en los ratones TgDyrk1A en los dos cortes de edad fue analizada en el campo abierto, un entorno novedoso con un grado de aversividad moderado. Sin embargo, una de las características diferenciales entre ratones con reducción y aumento de expresión de Dyrk1A es el nivel de ansiedad que muestran los animales. En el ratón transgénico el fenotipo ansioso podría determinar alteraciones fenotípicas que enmascarasen los resultados de otras pruebas conductuales. Por ello se analizó de forma específica la respuesta conductual a entornos con componente aversivo en el ratón TgDyrk1A.

Previamente había sido descrito que en esta prueba los animales TgDyrk1A adultos presentan hiperactividad moderada (Altafaj et al. 2001) como indica el incremento de la distancia recorrida (Figura 14A) y la realización de un número significativamente mayor de deambulaciones (Figura 14B) comparados con los ratones control. Con el envejecimiento, aunque la tendencia a la hiperactividad persistía en los ratones transgénicos, no resultó significativa. El análisis estadístico de estos dos parámetros reveló una marcada reducción de la actividad horizontal edad-dependiente (efecto de edad, $P < 0.001$, ANOVA) si bien no se observó una interacción genotipo-edad, indicando que la disminución observada con la edad era similar en ambos genotipos.

En cuanto a la actividad vertical, el ratón TgDyrk1A adulto realiza un mayor número de enderezamientos (efecto de genotipo, $P < 0.05$, ANOVA) (Altafaj et al. 2001) que sus homólogos control. Sin embargo, el TgDyrk1A viejo mantiene una tendencia al incremento de actividad vertical pero sin alcanzar la significación (Figura 14C). No se observaron diferencias importantes asociadas a la edad en ningún genotipo en cuanto a la actividad vertical, indicando que se trata de un parámetro relativamente estable.

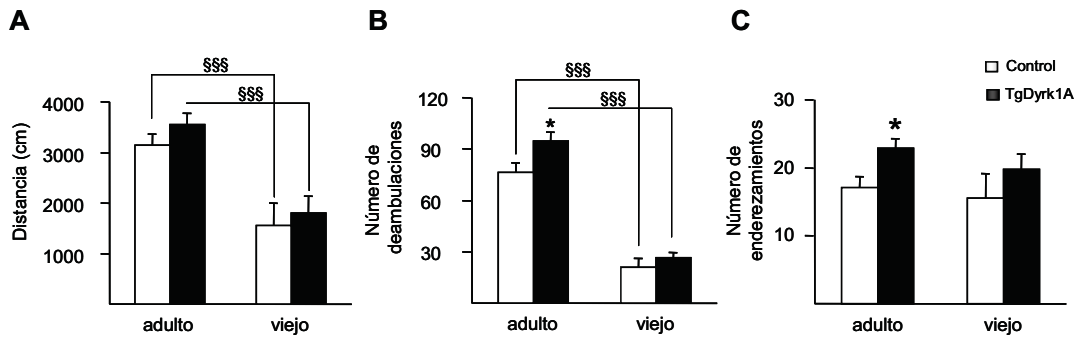


Figura 14. Cambios en la actividad locomotora en un entorno novedoso en TgDyrk1A con el envejecimiento. Comparación de A) la distancia total recorrida, B) el número de deambulaciones y C) el número de enderezamientos realizados en el campo abierto en los genotipos de estudio en dos cortes transversales de edad (control adulto $n = 24$; TgDyrk1A adulto $n = 28$; control viejo $n = 9$; TgDyrk1A viejo $n = 16$). Los datos están expresados como media \pm E.E.M. Diferencias entre genotipos $*P < 0.05$; diferencias entre edades en un mismo genotipo $§§§ P < 0.001$.

En el campo abierto para definir la conducta relacionada con ansiedad se determinó el índice periferia-centro (Figura 15). En trabajos previos de nuestro laboratorio se había descrito una marcada reducción de este parámetro en el TgDyrk1A adulto (efecto de genotipo, $P < 0.001$, ANOVA) como resultado de una mayor permanencia en la zona central, indicando un nivel de ansiedad menor (Altafaj et al. 2001). Con el envejecimiento, los controles redujeron significativamente su nivel de ansiedad con respecto a la etapa adulta (efecto de edad, $P < 0.01$, ANOVA), mientras que en el animal transgénico no se observaron diferencias entre los dos cortes de edad en el nivel de ansiedad.

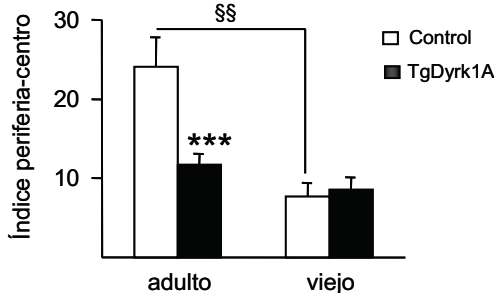


Figura 15. Efecto de la edad en la ansiedad en ratones TgDyrk1A. Representación del índice periferia-centro definido como la proporción de los porcentajes de permanencia entre periferia y centro en dos cortes de edad diferentes (control adulto $n = 24$, TgDyrk1A adulto $n = 28$; control viejo $n = 9$, TgDyrk1A viejo $n = 16$). Los datos se expresan como media \pm E.E.M. Diferencias entre genotipos $***P < 0.001$, diferencias entre edades en un mismo genotipo $§§ P < 0.01$.

El laberinto elevado en cruz a pesar de ser una prueba con un elevado grado de ansiogenicidad, permite evaluar la actividad en un entorno aversivo. En esta prueba, aunque los ratones TgDyrk1A recorrieron más distancia total en las dos edades de estudio comparados con los animales control, estas diferencias no alcanzaron la significación estadística (Figura 16A). De todos modos, al igual que en la prueba del campo abierto se observó una disminución de la actividad en ambos genotipos con el envejecimiento (efecto de edad, control $P < 0.001$, TgDyrk1A $P < 0.01$, ANOVA). En cuanto a la actividad vertical, no se observaron diferencias entre ambos genotipos en el número de enderezamientos en los dos cortes de edad estudiados (Figura 16B). En el laberinto elevado en cruz, la actividad en los brazos abiertos se mantiene con la edad, mientras que la actividad en brazos cerrados, indicativa de actividad locomotora resulta significativamente alterada. En efecto, el análisis del número de entradas en brazos cerrados indicó que durante la etapa adulta no existían diferencias entre genotipos, pero con el envejecimiento los animales control redujeron muy significativamente su actividad (efecto de edad, $P < 0.01$, ANOVA), mientras que los cambios no fueron tan ostensibles en los animales TgDyrk1A, lo que determinó que los ratones TgDyrk1A realizaron un número de entradas significativamente mayor que los controles viejos (efecto de genotipo, $P < 0.05$, ANOVA) (Figura 16C).

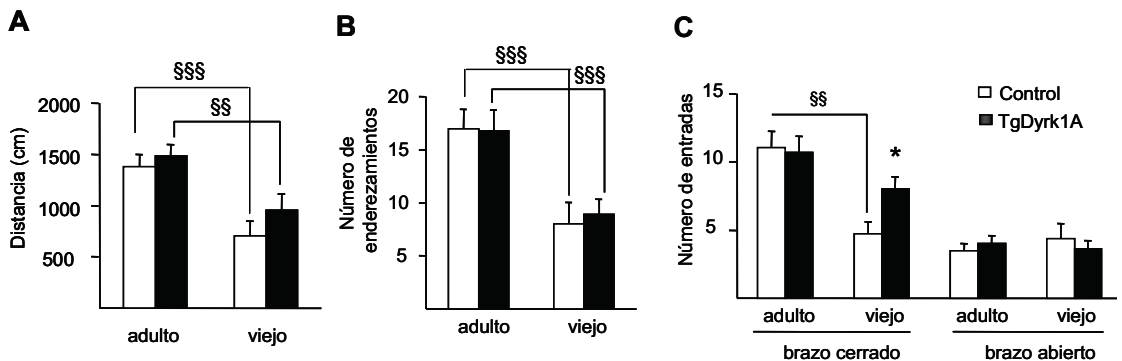


Figura 16. Efecto de la edad en la actividad realizada en el laberinto elevado en cruz en TgDyrk1A. Representación de A) la distancia recorrida, B) el número de enderezamientos y C) el número de entradas realizadas en brazos cerrados y abiertos en dos transversales de edad (control adulto $n = 11$, TgDyrk1A adulto $n = 17$; control viejo $n = 11$; TgDyrk1A viejo $n = 15$). Los datos están expresados como media \pm E.E.M. Diferencias entre genotipos $*P < 0.05$. Diferencias entre edades en un mismo genotipo $\$ \$ P < 0.01$, $\$ \$ \$ P < 0.001$.

2.1.4. Modificaciones de los parámetros sensoriomotores en ratones TgDyrk1A asociadas a la edad

Evaluación de la marcha en el ratón TgDyrk1A

En la prueba de la impronta de pisadas no se observaron diferencias entre ambos genotipos adultos ni en el número de pisadas ni en la distancia media entre ellas. Sin embargo, los ratones TgDyrk1A viejos realizaron un número significativamente menor de pasos y de una distancia más larga con respecto a la edad adulta (efecto de edad, $P < 0.001$, $P < 0.01$, para cada parámetro, ANOVA) y a los ratones control viejos (efecto de genotipo, $P < 0.05$ en ambas medidas, ANOVA) (Figura 17A y 17B).

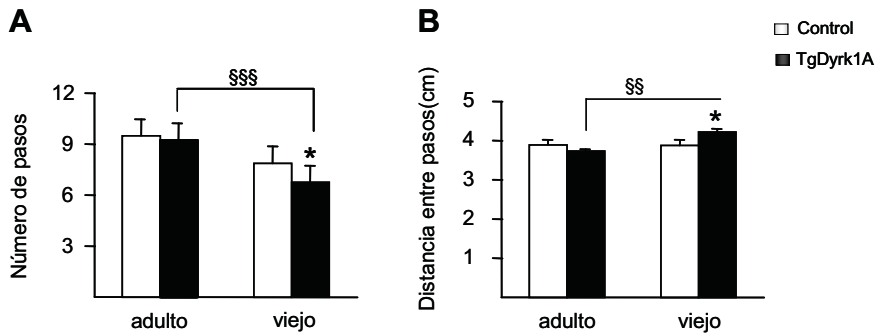


Figura 17. Análisis del patrón de marcha en los ratones TgDyrk1A. Representación de A) el número de pisadas realizadas y B) la distancia media entre pasos en dos cortes de edad (control adulto $n = 10$; TgDyrk1A adulto $n = 10$; control viejo $n = 4$; TgDyrk1A viejo $n = 6$). Los datos se expresan como media \pm E.E.M. Diferencias entre genotipos * $P < 0.05$; diferencias entre edades en un mismo genotipo §§ $P < 0.01$, §§§ $P < 0.001$.

Caracterización del patrón de natación en el ratón Tgdyrk1A

Dentro de la caracterización del fenotipo motor del TgDyrk1A, una de las pruebas seleccionadas fue la prueba de natación, dado que permite determinar alteraciones sutiles del fenotipo motor gracias a la profundidad del nivel de análisis que abarca aspectos no detectables en otras pruebas. Sin embargo, debido al gran esfuerzo físico que comporta, no fue posible su realización en animales viejos. Aún así, a pesar de no tener datos sobre el perfil neurodegenerativo en esta prueba, se presentan los resultados de la misma ya que son indicativos de alteraciones cualitativas en la actividad de los animales, que no quedan reflejadas en otras

pruebas. Durante los 10 min de duración de la prueba no se observaron diferencias en la velocidad de natación, lo que sugiere que el nivel de fatiga era similar en ambos genotipos. Asimismo, no se observó correlación ($r = 0.055$, $P = 0.89$; test de correlación de Pearson) entre la velocidad de natación y el tiempo de actividad, definido como el porcentaje de tiempo empleado en nadar en una trayectoria lineal. Esto asegura que la evaluación del resto de los parámetros no se vería confundida o enmascarada por un posible efecto inespecífico, no relacionado con el patrón de actividad.

Los ratones TgDyrk1A mostraron un incremento en la actividad no-lineal pudiéndose considerar ésta como una actividad motora errática. De hecho, los ratones transgénicos realizaron un número de paradas e inicios de actividad (salvas de actividad) significativamente mayor que los controles (efecto DE genotipo, $P = 0.02$, ANOVA) (Figura 18A). Estos períodos de actividad se caracterizaban por ser más cortos (efecto de genotipo, $P = 0.01$, ANOVA) (Figura 18B) y presentar un número de paradas (periodos de inactividad de duración entre 1 y 5 s) significativamente mayor (efecto de genotipo, $P = 0.007$, ANOVA) (Figura 18C). Así pues, los animales TgDyrk1A, mostraron un patrón de natación más irregular y desorganizado. Finalmente, el tiempo de inmovilidad, definido como la duración acumulada de periodos de inactividad mayores de 5 s y separados entre sí al menos 1s, mostraba una tendencia no significativa a la reducción en ratones TgDyrk1A respecto a los controles (efecto de genotipo, $P = 0.1$, ANOVA) (Figura 18D). Esta diferencia se debía a que la duración media de los periodos de reposo era significativamente menor en nuestro modelo (efecto de genotipo, $P = 0.02$, ANOVA) (Figura 18E).

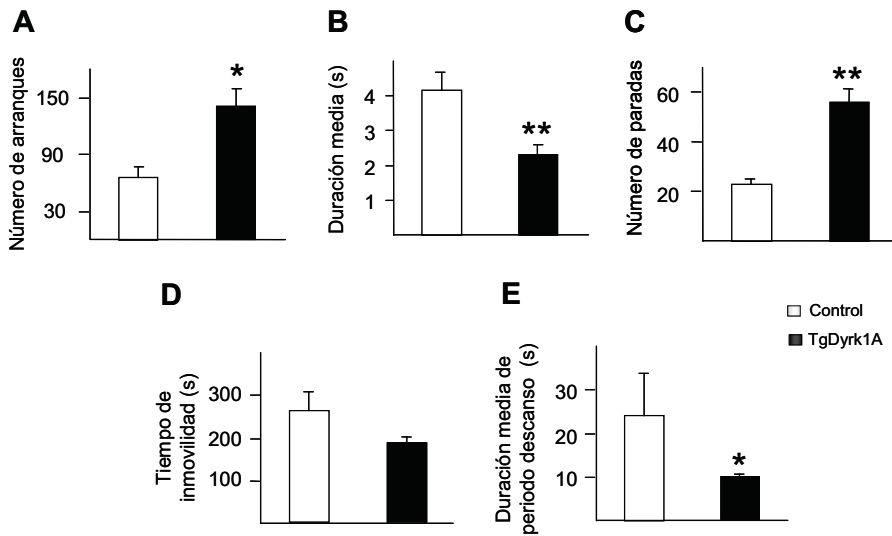


Figura 18. Caracterización del patrón de natación en ratones TgDyrk1A. Representación del A) número de arranques y de B) la duración media de éstos, así como C) el número de paradas, D) el tiempo que permanece inmóvil durante más de 5 s y E) la duración media de los periodos de reposo realizada por los animales (controles n = 5; TgDyrk1A n= 9). Los datos se expresan como media ± E.E.M. Diferencias entre genotipos * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Finalmente, la actividad en la periferia del tanque o tigmotaxia, se encontraba reducida en los animales TgDyrk1A, como demuestra el incremento en la distancia recorrida por el centro de la piscina con respecto a los animales control (efecto de genotipo, $P < 0.05$, ANOVA) (Figura 19A y 19B).

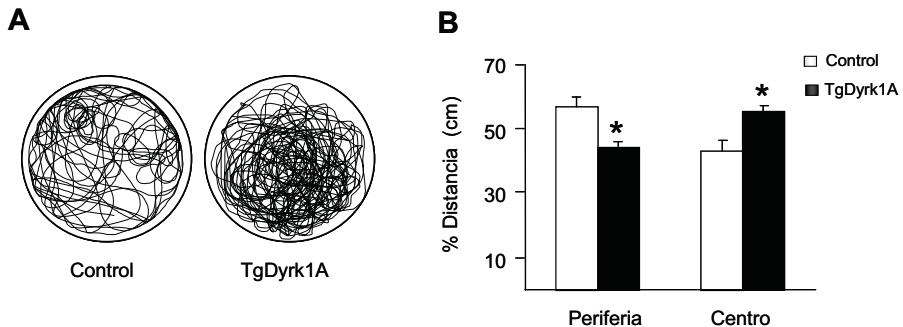


Figura 19. Análisis del patrón de natación en TgDyrk1A. A) Trayectorias de natación representativas de ambos genotipos ilustrando como el animal TgDyrk1A presenta un patrón de natación más irregular predominante en la zona central. B) Porcentaje de la distancia recorrida en la zona central y periférica (controles n = 5; TgDyrk1A n = 9). Los datos se expresan como media ± E.E.M. Diferencias entre genotipos * $P < 0.05$.

Deterioro del equilibrio con el envejecimiento en el ratón TgDyrk1A

Al analizar la prueba de equilibrio, no se observan diferencias entre ambos genotipos en sendos cortes de edad. Sin embargo, existe un deterioro importante del equilibrio con el envejecimiento como demuestra la disminución de la puntuación obtenida en la primera sesión de la prueba en ambos genotipos (efecto de edad: control $P < 0.001$, TgDyrk1A $P < 0.01$, ANOVA) indicando que los animales permanecen en la zona central de la barra. En la segunda sesión, más indicativa de la actividad sobre la barra, los animales TgDyrk1A viejos comparados con sus respectivos controles mostraron menos actividad sobre la barra (efecto de genotipo, $P < 0.05$, ANOVA) (Figura 20).

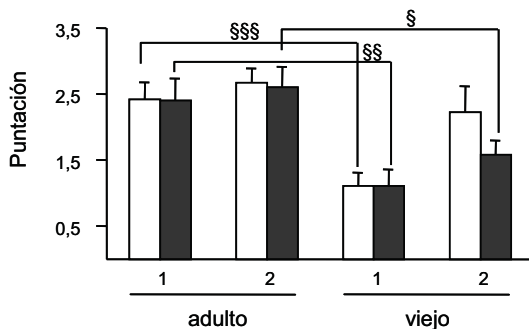


Figura 20. Efecto de la edad en el equilibrio del ratón TgDyrk1A. Representación de la ejecución sobre la barra de equilibrio en ambos genotipos y a diferentes edades (control adulto $n = 12$; TgDyrk1A adulto $n = 10$; control viejo $n = 9$; TgDyrk1A viejo $n = 19$). Los datos se expresan como media \pm E.E.M. Diferencias entre edades en un mismo genotipo § $P < 0.05$, §§ $P < 0.01$, §§§ $P < 0.001$.

Efecto de la edad sobre la fuerza muscular en el ratón TgDyrk1A

El análisis de la fuerza muscular no reveló diferencias entre ambos genotipos ni con la edad en este parámetro. De igual manera, no se observaron diferencias entre genotipos ni con la edad en el reflejo prensil en la prueba de la percha (Figura 21A). El mismo patrón se observó cuando se midió la fuerza muscular con un dinamómetro tanto al analizar la fuerza ejercida por las patas delanteras como por las cuatro patas a la vez (Figura 21B).

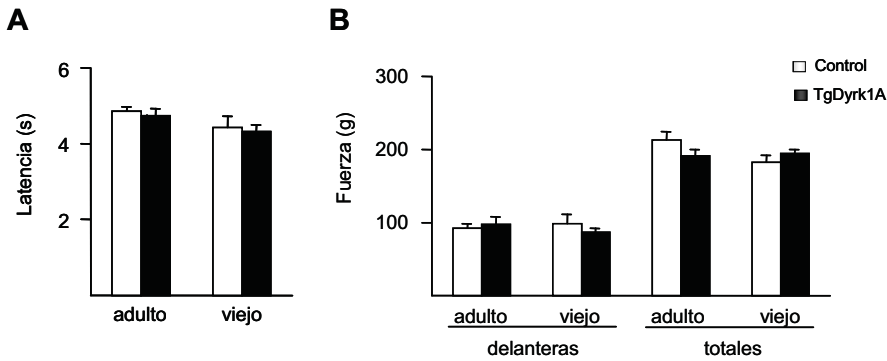


Figura 21. Efecto de la edad en la fuerza muscular y el reflejo prensil en ratón TgDyrk1A. Se muestra la fuerza muscular en los dos cortes de edad estudiados (control adulto $n = 12$; TgDyrk1A adulto $n = 10$; control viejo $n = 10$; TgDyrk1A viejo $n = 21$). A) Reflejo prensil: representación del tiempo que los animales permanecen aferrados a la percha (latencia máxima: 5s). B) Análisis de la fuerza muscular medida mediante dinamómetro. Los datos se expresan como media \pm E.E.M.

Alteraciones en la coordinación y aprendizaje motor en el ratón TgDyrk1A con la edad

En la prueba del rodillo giratorio no se observaron diferencias en la curva de latencia a velocidades crecientes constantes entre ambos genotipos en ninguno de los dos cortes de edad (Figura 22A). Sin embargo, con el envejecimiento, ambos genotipos experimentaron un deterioro significativo en la realización de la prueba (efecto de edad, controles: $P < 0.01$, TgDyrk1A: $P < 0.05$ ANOVA de medidas repetidas). Esta alteración se observó de forma más importante a velocidades bajas cuando la demanda de la tarea es menor (efecto edad, controles: vel 7 rpm $P < 0.05$, vel 14 rpm $P < 0.01$, vel 19 rpm $P < 0.05$; TgDyrk1A: vel 7 rpm $P < 0.05$, vel 14 rpm $P < 0.01$, posthoc Bonferroni), sugiriendo que no se trata de un problema de coordinación.

En un segundo experimento dirigido al análisis de la coordinación motora se utilizó la prueba de la cinta giratoria sinfín (Figura 22B). Esta prueba requiere una mayor capacidad de integración motora que el rodillo giratorio permitiendo detectar diferencias en coordinación más sutiles y menos dependientes de factores motivacionales, al utilizar un estímulo aversivo (descargas eléctricas suaves en las patas). Por otra parte, aunque podría considerarse una prueba de esfuerzo, el paradigma empleado reduce la fatiga, al emplear tiempos cortos, aumentando, sin embargo, la dificultad mediante incrementos en velocidad y pendiente. De nuevo,

debido a la agresividad de la prueba, sólo fue posible realizarla en animales adultos. En los animales TgDyrk1A adultos la coordinación motora se encontraba marcadamente afectada con respecto a los controles siendo la curva de descargas eléctricas recibidas significativamente diferente en ambos genotipos (efecto de genotipo, $P < 0.001$, ANOVA de medidas repetidas). En consonancia, el tiempo acumulado de shock recibido era significativamente mayor en varias de las velocidades analizadas (efecto de genotipo, vel 10 cm/s $P < 0.05$, vel 20 cm/s $P < 0.01$, vel 30 rpm $P < 0.001$, posthoc Bonferroni).

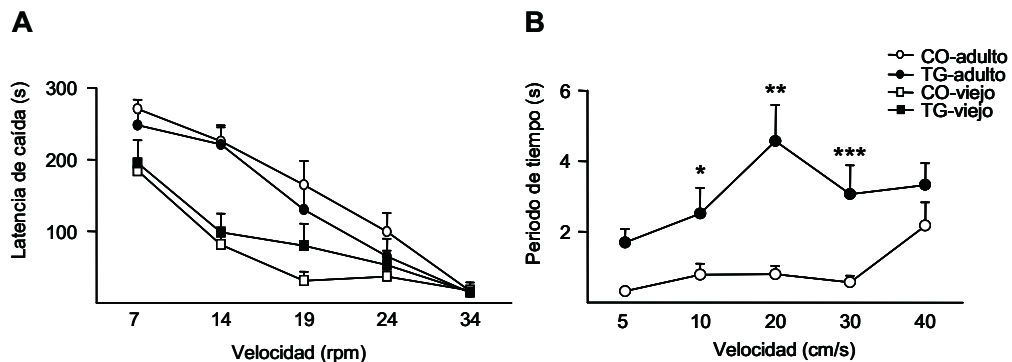


Figura 22. Efecto de la edad en la coordinación motora en el ratón TgDyrk1A. A) Latencia de caída del rotarod cuando se somete al animal a velocidades constantes crecientes (control adulto $n = 15$; TgDyrk1A adulto $n = 14$; control viejo $n = 5$; TgDyrk1A viejo $n = 10$). B) Representación del periodo de tiempo acumulado de shock en la cinta andadora (inclinación 20°) (control adulto $n = 10$; TgDyrk1A adulto $n = 14$). Los datos están expresados como media \pm E.E.M. Diferencias entre genotipos * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

El registro del tiempo acumulado de shock recibido durante dos ensayos de aprendizaje a la velocidad de 5 cm/s e inclinación mínima (5°) mostró que mientras los animales control adultos aprendían la tarea y por lo tanto, reducían el tiempo de shock, a lo largo de los dos ensayos los TgDyrk1A no adquirían la tarea tan eficazmente (efecto de genotipo, $P < 0.05$, ANOVA de medidas repetidas) (Figura 23A). Esta alteración en el aprendizaje motor se observó asimismo en el rotarod, donde el ratón TgDyrk1A adulto requería un número significativamente mayor de ensayos para mantenerse sobre la rueda del rotarod durante 4 min (efecto genotipo, $P < 0.05$, ANOVA) (Figura 23B). Estas diferencias entre genotipos también aparecían con el envejecimiento en la tarea de aprendizaje en el rotarod, sin que alcanzaran significación estadística.

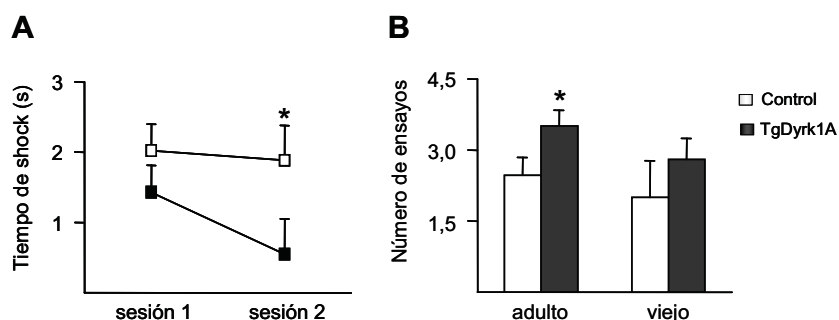


Figura 23. Efecto de la edad en el aprendizaje motor en el ratón TgDyrk1A. A) Representación del tiempo acumulado de shock en dos sesiones de demanda motora baja (velocidad 5 cm/s e inclinación de la cinta 5°) en la cinta móvil como indicador del aprendizaje motor (control n = 10, TgDyrk1A n = 14) y B) del número de sesiones requeridas para que los animales se matengan en equilibrio durante 180 segundos sobre el rodillo girando a la velocidad mínima (4 rpm) (control adulto n = 15; Dyrk1A adulto n = 14; control viejo n = 5; TgDyrk1A viejo n = 10). Los datos están expresados como media ± E.E.M. Diferencias entre genotipos * $P < 0.05$.

2.2. El modelo de sobreexpresión de Dyrk1A presentó alteraciones poco relevantes en el sistema dopaminérgico nigroestriatal

2.2.1. Análisis estereológico de la Sustancia Negra pars compacta en el ratón TgDyrk1A

El estudio estereológico de la sustancia negra pars compacta (SNpc) no reveló diferencias importantes en el volumen de este núcleo entre los animales TgDyrk1A y sus respectivos controles. Asimismo, no se observaron diferencias en la densidad ni en el número de neuronas dopaminérgicas, marcadas con un anticuerpo anti-tirosin hidroxilasa (TH). La determinación de la densidad celular y el número total de células de este núcleo tampoco mostró modificaciones entre genotipos (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis estereológico de las neuronas TH positivas en SNpc en el ratón TgDyrk1A

SNpc	Control	TgDyrk1A
Volumen (mm ³)	0.27 ± 0.03	0.27 ± 0.03
Densidad TH (número TH positiva/mm ³)	36952 ± 3044	34049 ± 1140
Número de TH positiva	9741 ± 940	9139 ± 697
Densidad celular (célula/mm ³)	193893 ± 24735	194194 ± 24696
Número de células totales	54355 ± 12370	25349 ± 8170

Volumen, densidad de TH positivas y celular y del número de células Th positivas y totales en el núcleo dopaminérgico SNpc en TgDyrk1A en dos cortes de edad (5 animales por grupo). Los datos se expresan como media ± E.E.M.

2.2.2. Inducción de catalepsia tras la administración de antagonistas dopaminérgicos en el ratón TgDyrk1A

La administración de antagonistas dopaminérgicos permitió estudiar la sensibilidad de los ratones TgDyrk1A a estos fármacos analizando el tiempo de catalepsia provocado. La administración intraperitoneal de dosis crecientes del antagonista selectivo D1 SCH-23390 produjo un incremento del tiempo de catalepsia dosis-dependiente (efecto de fármaco, $P < 0.005$, ANOVA de medidas repetidas) sin observarse diferencias entre genotipos (Figura 24A). Por el contrario, aunque en ambos genotipos se observó un aumento del tiempo de catalepsia tras la administración de dosis crecientes del antagonista D2 haloperidol (efecto de fármaco, $P < 0.001$, ANOVA de medidas repetidas), el efecto cataléptico en el TgDyrk1A fue significativamente menor (interacción tratamiento-genotipo $P < 0.01$, ANOVA de medidas repetidas), estableciéndose las diferencias fundamentalmente a las dosis más altas del fármaco (2 y 4 mg/kg $P < 0.05$, posthoc Bonferroni) (Figura 24B).

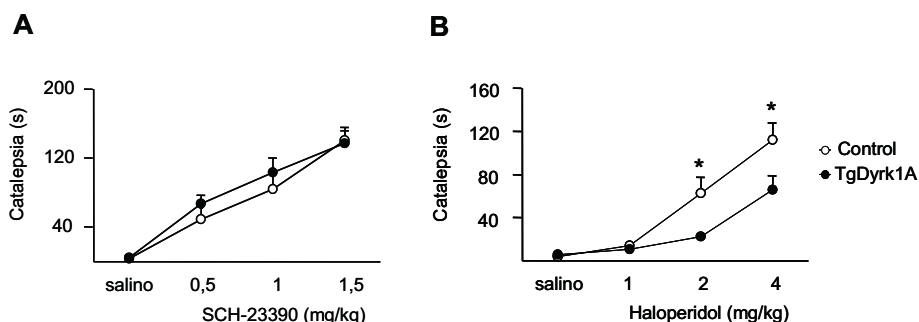


Figura 24. Efecto cataléptico en TgDyrk1A. Tiempo de catalepsia producido en el test de la barra tras la administración de dosis crecientes A) del antagonista D1 SCH-23390 y B) del antagonista D2 haloperidol (control $n = 16$, TgDyrk1A $n = 15$). Los datos se expresan como media \pm E.E.M. Diferencias entre genotipos * $P < 0.05$.

2.2.3. Efecto de agonistas dopaminérgicos sobre la actividad en el ratón TgDyrk1A

La administración del agonista D2 quinpirole produjo una marcada reducción en la distancia recorrida por ambos genotipos (efecto fármaco, $P < 0.01$, ANOVA de dos vías). Así, con respecto a la administración de salino en ambos genotipos se produjo una reducción significativa de actividad a las dos dosis empleadas (efecto fármaco, 1 mg/kg: control $P < 0.05$ y TgDyrk1A $P < 0.05$; 2 mg/kg: control $P < 0.01$ y TgDyrk1A $P < 0.01$, ANOVA). La sensibilidad al fármaco fue similar en ambos genotipos a las dos dosis utilizada (interacción genotipo-tratamiento $P = 0.98$, ANOVA de dos vías) (Figura 25A).

Por otro lado, la actividad horizontal fue analizada durante 30 minutos tras la administración del agonista indirecto anfetamina (5mg/kg). La administración del fármaco produjo un progresivo incremento en la actividad de los animales (efecto fármaco $P < 0.01$, ANOVA de dos vías), similar en ambos genotipos (interacción genotipo-tratamiento $P = 0.84$, ANOVA de dos vías) (Figura 25B).

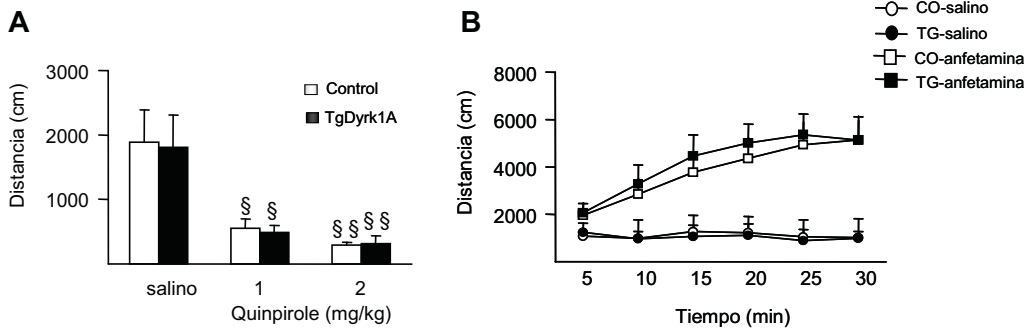


Figura 25. Actividad en el campo abierto tras la administración de agonistas dopaminérgicos en TgDyrk1A. A) Representación de la distancia recorrida tras administración vía IP de salino o agonista D2 quinpirole (1 y 2 mg/kg). B) Representación de la distancia recorrida en intervalos de 5 minutos durante 30 minutos tras la administración de salino o anfetamina (5mg/kg) (control n = 7; TgDyrk1A n = 7). Los datos se expresan como media ± E.E.M. Diferencias entre tratamientos en un mismo genotipo § $P < 0.05$, §§ $P < 0.05$.

2.3. El modelo de sobreexpresión de Dyrk1A presentó un deterioro cognitivo con el envejecimiento principalmente en la memoria reciente

2.3.1. Declive del aprendizaje y memoria visuo-espacial asociado a la edad en el ratón TgDyrk1A

En trabajos previos de nuestro grupo se habían demostrado cambios significativos en memoria visuo-espacial derivados de la sobreexpresión de Dyrk1A, utilizando un laberinto acuático. Esta misma prueba se ha utilizado en esta Tesis para determinar los cambios asociados a la edad en el ratón TgDyrk1A.

La comparación entre genotipos tanto en los animales adultos como en los viejos no mostró diferencias ni en la latencia de llegada a la plataforma ni en la distancia recorrida durante la sesión de entrenamiento (training) lo que permitió descartar alteraciones en el aprendizaje de procedimiento (Figura 26A y 26B). Sin embargo, ya en esta primera sesión del experimento se observó que los animales viejos nadaban mas lentamente comparados con los animales adultos en ambos genotipos, un efecto que resultó ser más acusado en TgDyrk1A (efecto de edad, control: $P = 0.13$, TgDyrk1A: $P < 0.005$, ANOVA) (Figura 26C).

El análisis de la curva de adquisición indicó que, aunque en todos los casos se producía el aprendizaje (efecto de tiempo, $P < 0.05$, ANOVA de medidas repetidas), aparecían diferencias dependientes de la edad (efecto edad $P < 0.005$, ANOVA de medidas repetidas) de manera que en ambos genotipos la ejecución de la prueba mostraba un deterioro dependiente de edad (Figura 26A). Por otro lado, tanto en ratones adultos como en animales viejos no existían diferencias entre genotipos a pesar de que en ambos casos los ratones TgDyrk1A tardaban más en llegar a la plataforma, siendo en los animales viejos cuando esta tendencia se acerca a la significación (efecto de genotipo, $P = 0.10$, ANOVA de medidas repetidas). En cuanto a la distancia recorrida, se observó una marcada reducción en los animales control (efecto de edad, $P < 0.05$, ANOVA de medidas repetidas), mientras que en los animales transgénicos no resultó relevante (Figura 26B). De todos modos, al igual que durante la sesión de entrenamiento, se observaron disminuciones importantes edad-dependientes en la velocidad de los animales control y los TgDyrk1A (efecto de edad, control: $P < 0.05$, TgDyrk1A: $P < 0.005$, ANOVA de medidas repetidas). Este parámetro estaba más afectado en el ratón TgDyrk1A viejo (Figura 26C), que resultó ser significativamente más lento que los controles viejos (efecto de genotipo, $P < 0.05$, ANOVA de medidas repetidas) por lo que, a pesar de tardar más en alcanzar la plataforma, la distancia recorrida fue menor.

Finalmente, en la sesión de aprendizaje guiado con la plataforma visible y marcada con una bandera los animales adultos mostraron una latencia de escape similar a la de la última sesión de adquisición, sin embargo los animales viejos de ambos genotipos realizaron latencias más altas (control: A4 34 s, CUE 25 s; TgDyrk1A: A4 37s, CUE 31s) (Figura 26A). De manera similar, no se observaron diferencias en la distancia recorrida entre genotipos a ambas edades, si bien, los animales viejos de ambos genotipos realizaron distancias inferiores con respecto a la recorrida en la última sesión de adquisición (Figura 26B). A pesar, de que estas alteraciones podrían ser interpretadas como un deterioro en los animales viejos de forma que las cuatro sesiones de adquisición no fueron suficientes para alcanzar el nivel máximo de aprendizaje, nuevamente se detectaron importantes variaciones en la velocidad de natación en los animales viejos que podrían explicar este efecto. En este sentido, los ratones TgDyrk1A viejos nadaron más lentamente que sus respectivos

controles (efecto genotipo, $P < 0.05$, ANOVA) y que los TgDyrk1A adultos (efecto edad, $P < 0.001$, ANOVA) (Figura 26C).

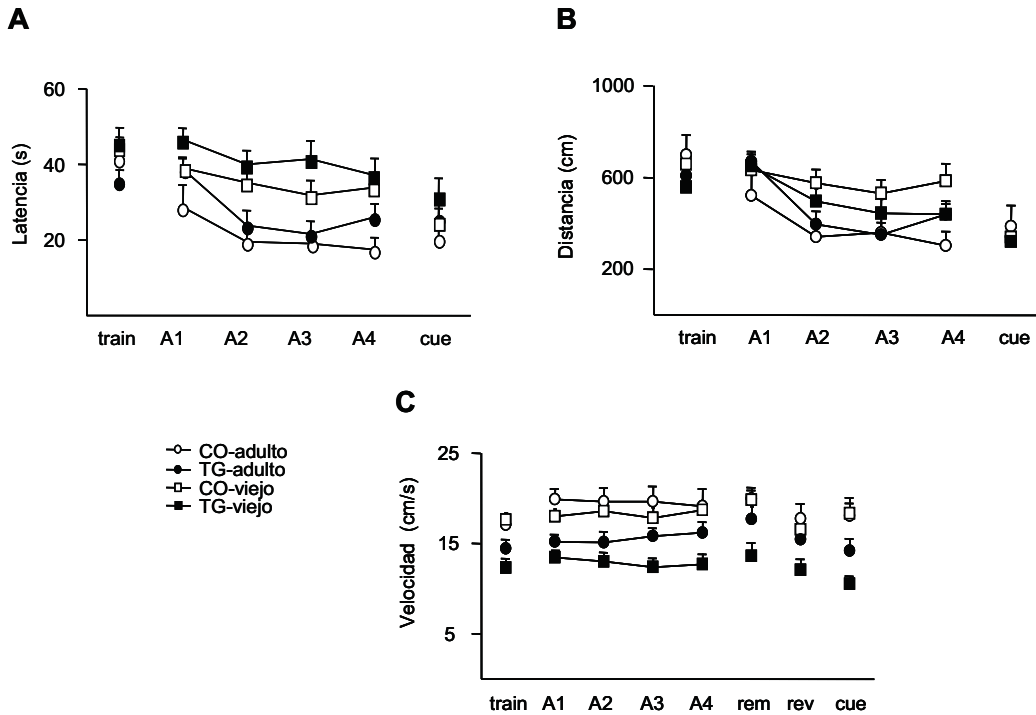


Figura 26. Efecto de la edad sobre la memoria visuo-espacial en el laberinto acuático en el ratón TgDyrk1A. Representación de A) la latencia de llegada a la plataforma, B) la distancia recorrida y C) la velocidad de natación en las sesiones de entrenamiento (train), adquisición (A1, A2, A3, A4), aprendizaje guiado (cue), retirada de la plataforma (rem) y cambio de posición de la plataforma (rev) en ambos genotipos a dos edades diferentes (control adulto $n = 8$; TgDyrk1A adulto $n = 20$; control viejo $n = 18$; TgDyrk1A viejo $n = 11$). Los datos se expresan como media \pm E.E.M.

En la sesión de retirada de la plataforma, que permite analizar más específicamente la memoria visuo-espacial se observó una mayor preferencia por el cuadrante entrenado en los animales control adultos respecto a los TgDyrk1A, expresada por un mayor tiempo de permanencia en éste (efecto de genotipo, $P < 0.05$, ANOVA) (Figura 27A). En los animales viejos, la preferencia por el cuadrante entrenado fue similar entre genotipos. Al igual que sucedía en el resto de las sesiones, la velocidad de natación en esta sesión fue menor en los animales TgDyrk1A viejos respecto a los controles viejos (efecto de genotipo $P < 0.05$, ANOVA) y a los ratones transgénicos adultos (efecto de edad, $P < 0.001$, ANOVA) (Figura 27B).

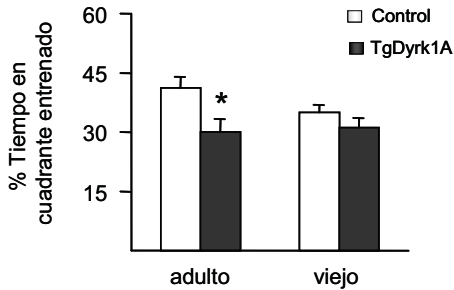


Figura 27. Efecto de la edad sobre la memoria visuo-espacial en la sesión de retirada de la plataforma en ratón TgDyrk1A. Representación del porcentaje de tiempo de permanencia en el cuadrante entrenado en el laberinto acuático en dos cortes de edad (control adulto n = 8; TgDyrk1A adulto n = 20; control viejo n = 18; TgDyrk1A viejo n = 11). Los datos están expresados como media \pm E.E.M. Diferencias entre genotipos * $P < 0.05$.

Finalmente, la capacidad de aprender una nueva localización de la plataforma, analizada en la sesión de cambio de posición de la misma, no mostró diferencias en la latencia de llegada a la plataforma entre ambos genotipos, indicando que la capacidad de aprender la nueva posición de la plataforma no estaba alterada como consecuencia de la sobreexpresión de Dyrk1A (Figura 28). En ambos genotipos se observó una tendencia al incremento en la latencia de llegada a la plataforma dependiente de edad aunque esta diferencia no alcanzó a ser significativa

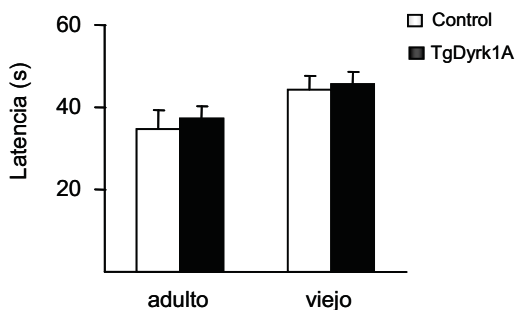


Figura 28. Efecto de la edad sobre la flexibilidad cognitiva en la sesión de cambio de posición de la plataforma en el ratón TgDyrk1A. Representación de la latencia de llegada a la plataforma localizada en la posición opuesta al cuadrante entrenado en dos cortes de edad (control adulto n = 8; TgDyrk1A adulto n = 20; control viejo n = 18; TgDyrk1A viejo n = 11). Los datos están expresados como media \pm E.E.M.

2.3.2. Efecto de la edad sobre la memoria reciente en el ratón TgDyrk1A

La memoria reciente fue evaluada empleando la prueba de la evitación pasiva (Figura 29). No se observaron diferencias en la latencia de descenso de la plataforma durante la primera exposición al aparato, lo que descarta posibles alteraciones en emotividad y/o impulsividad en esta prueba, que podrían afectar a su ejecución posterior. Durante la sesión realizada a las 24 horas de la exposición al primer shock, la latencia de descenso era parecida en ambos genotipos en los animales adultos. Sin embargo los ratones TgDyrk1A viejos descendían de la

plataforma con una latencia significativamente menor (efecto de genotipo, $P < 0.05$, Mann-Whitney U-test), sugiriendo alteraciones en memoria reciente con el envejecimiento en nuestro modelo. Al analizar la retención de la tarea a medio plazo (7 días después del entrenamiento) se observó que el animal transgénico tanto adulto como viejo tendía a bajar de la plataforma antes, si bien esta diferencia no llegaba a alcanzar significación estadística (efecto de genotipo, adulto $P = 0.1$; viejo $P = 0.07$, Mann-Whitney U-test). Con el envejecimiento se observó un claro empeoramiento de la ejecución en ambos genotipos en esta sesión, que sin embargo sólo alcanzó significación en los animales TgDyrk1A (efecto de edad, $P < 0.05$, Mann-Whitney U-test).

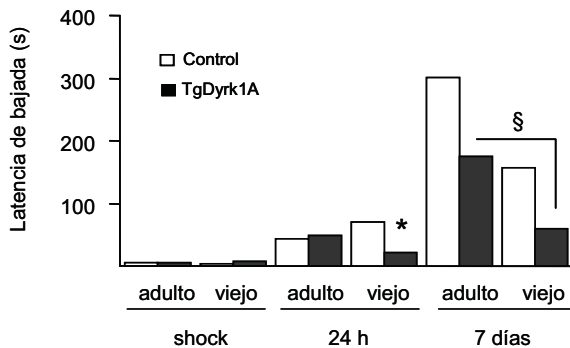


Figura 29. Efecto de la edad en la memoria reciente en ratón TgDyrk1A. Representación de la latencia de bajada de la plataforma en la prueba de evitación pasiva, a las 24 horas y a los 7 días en ambos genotipos en dos cortes transversales de edad (control adulto $n = 11$; TgDyrk1A adulto $n = 12$; control viejo $n = 14$; TgDyrk1A viejo $n = 10$). Los datos están expresados como mediana. Diferencia entre genotipos * $P < 0.05$. Diferencia entre edades en un mismo genotipo § $P < 0.05$.

2.4. El modelo de sobreexpresión de Dyrk1A presentó una leve degeneración colinérgica con el envejecimiento

El sistema colinérgico juega un papel fundamental en los procesos de retención y memoria reciente. La alteración de los núcleos colinérgicos del prosencéfalo basal es patognomónica en la EA, habiéndose incluso propuesto una hipótesis colinérgica para la pérdida de capacidad cognitiva en esta enfermedad. Para caracterizar el sistema no solamente hemos analizado las características estructurales de los núcleos colinérgicos del prosencéfalo basal, sino los factores tróficos que sustentan su supervivencia, y cuya alteración se ha descrito en modelos murinos de SD (Cooper et al. 2001; Hunter et al. 2003; Seo y Isacson 2005)

2.4.1. Análisis estereológico de los núcleos colinérgicos del prosencéfalo basal en el ratón TgDyrk1A

En una primera fase experimental se estudiaron las características estructurales de dos núcleos colinérgicos del prosencéfalo basal: el núcleo septal medial (MSN) y la banda vertical diagonal (VDB), en los que se han descrito alteraciones relacionadas con el envejecimiento fisiológico y patológico. El análisis estereológico no mostró diferencias significativas en el volumen de ninguno de éstos núcleos entre genotipos en ninguno de los cortes de edad estudiados, aunque en animales viejos el volumen mostró una tendencia a la reducción que no llegó a alcanzar la significación estadística (Tabla 4). La reducción del volumen del MSN asociada a la edad se acompañó de una disminución no significativa del número de células totales (tinción de cresil violeta) (efecto de edad, control: $P = 0.16$; TgDyrk1A: $P = 0.07$ respecto a la edad adulta, ANOVA), sin modificaciones en la densidad celular (Tabla 4). De manera similar, en la VDB la celularidad total se encontraba reducida en los animales viejos de ambos genotipos respecto a la etapa adulta, aunque en menor grado de nuevo sin diferencias notables en la densidad celular (Tabla 4).

Tabla 4. Cambios en los núcleos colinérgicos VDB y MSN con la edad en el ratón TgDyrk1A

MSN	Adulto		Viejo	
	Control	TgDyrk1A	Control	TgDyrk1A
Volumen (mm ³)	0.31 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.26 ± 0.02
Densidad celular (célula/mm ³)	420500 ± 9211	413574 ± 7863	42678 ± 25372	373351 ± 17253
Número de células	124812 ± 11137	128680 ± 9054	99240 ± 12318	98919 ± 11113
VDB				
Volumen (mm ³)	0.38 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.32 ± 0.04	0.38 ± 0.04
Densidad celular (célula/mm ³)	431474 ± 15013	411016 ± 17235	435976 ± 35466	376604 ± 31288
Número de células	162589 ± 9937	150495 ± 10620	140382 ± 11584	146164 ± 4750

Volumen, densidad celular y número de células totales núcleos colinérgicos MSN y VDB en TgDyrk1A en dos cortes de edad (4-6 animales por grupo). Los datos se expresan como media ± E.E.M.

Cuando el análisis se restringió a las neuronas colinérgicas de los núcleos de estudio, positivas para colino acetiltransferasa (Chat), se observó que, pese a que en el animal adulto la densidad y el número de células Chat positivas en MSN era similar en ambos genotipos, en los animales TgDyrk1A viejos se produjo una reducción tanto en la densidad como en el número de neuronas colinérgicas (efecto de genotipo, $P = 0.05$, ANOVA). En los animales control se observó un incremento

de la densidad colinérgica con la edad (efecto de edad, $P < 0.05$, ANOVA), si bien el número total de éstas no se modificó (Figura 30A y 30B)

En la VDB no se observaron diferencias entre genotipos durante la etapa adulta, pero de nuevo el ratón TgDyrk1A viejo muestra una reducción significativa de la densidad de neuronas Chat positivas respecto a la edad adulta (efecto de edad, $P < 0.05$, ANOVA) y un menor número de neuronas marcadas, a pesar de no alcanzar la significación (efecto de edad, $P = 0.11$, ANOVA) (Figura 30C y 30D).

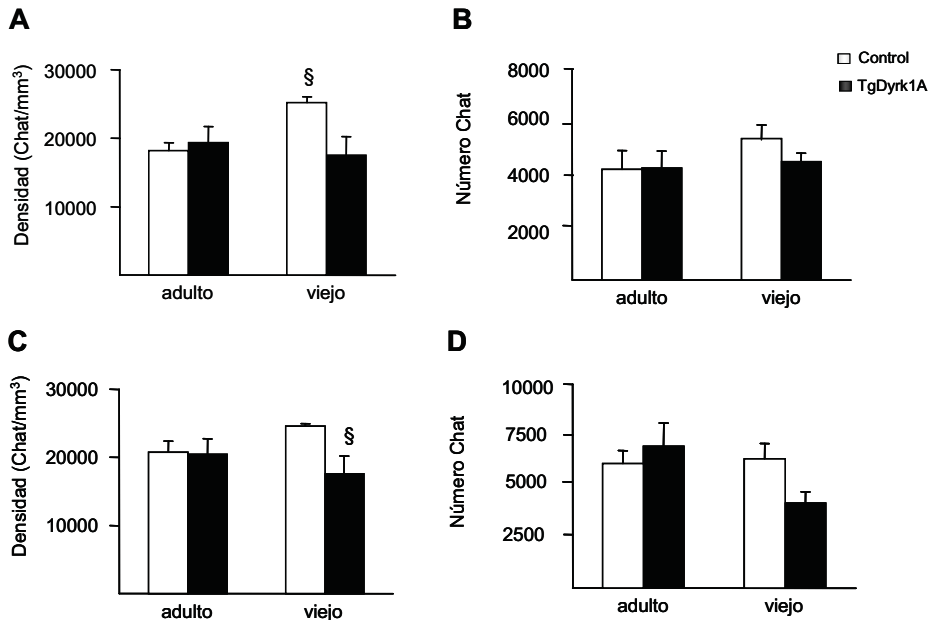


Figura 30. Análisis estereológico de los núcleos colinérgicos MSN y VDB marcados positivamente con anticuerpo anti-colino acetiltransferasa en TgDyrk1A. Representación de A) la densidad de neuronas y del B) número de células Chat positivas del núcleo MSN. Siguiendo el mismo esquema, C y D se corresponden con el núcleo VDB (4-6 animales por grupo). Los datos se expresan como media \pm E.E.M. Diferencias entre edades en un mismo genotipo § $P < 0.05$.

Cuando se analizaron las neuronas marcadas positivamente frente al receptor de neurotrofinas p75 en MSN, no se detectaron diferencias entre genotipos ni en la densidad ni en el número de células positivas en ninguno de los grupos de edad. Sin embargo, se observó una tendencia a la reducción en el número de células p75 positivas asociada a la edad en los animales TgDyrk1A (efecto de edad, $P = 0.10$, ANOVA) (Tabla 5).

En el caso del núcleo VDB se repitió el mismo patrón. Así, no se observaron diferencias entre genotipos en ambos cortes de edad al analizar el número de

neuronas p75 positivas y la densidad de éstas pero de nuevo se observó una disminución no significativa de neuronas p75 asociada a la edad en TgDyrk1A (efecto de edad, $P = 0.15$, ANOVA) (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis estereológico de las neuronas p75 positivas en los núcleos MSN y VDB en el ratón TgDyrk1A

MSN	Adulto		Viejo	
	Control	TgDyrk1A	Control	TgDyrk1A
Densidad p75 positiva ($p75/mm^3$)	16979 ± 1209	16345 ± 845	14854 ± 1520	13016 ± 778
Número de p75 positiva	4982 ± 563	5169 ± 761	4425 ± 1369	3386 ± 185
VDB				
Densidad p75 positiva (célula/ mm^3)	18578 ± 1883	22644 ± 1874	18562 ± 1864	16741 ± 2142
Número de p75 positiva	7128 ± 1023	8398 ± 950	5854 ± 586	6640 ± 1072

Densidad y número de neuronas p75 positivas en los núcleos colinérgicos MSN y VDB en TgDyrk1A en dos cortes de edad (4-6 animales por grupo). Los datos se expresan como media ± E.E.M.

2.4.2. Determinación de la concentración de NGF en el ratón TgDyrk1A

La concentración de NGF libre en el prosencéfalo basal, hipocampo y corteza frontal fue determinada en dos cortes de edad mediante ELISA, sin que se observaran diferencias importantes ni dependientes de genotipo ni asociadas a la edad en el prosencéfalo basal (Figura 31A), el hipocampo o la corteza frontal. En ambos cortes de edad los TgDyrk1A presentaron una mayor concentración de NGF comparado con sus respectivos controles (Figura 31B y 31C).

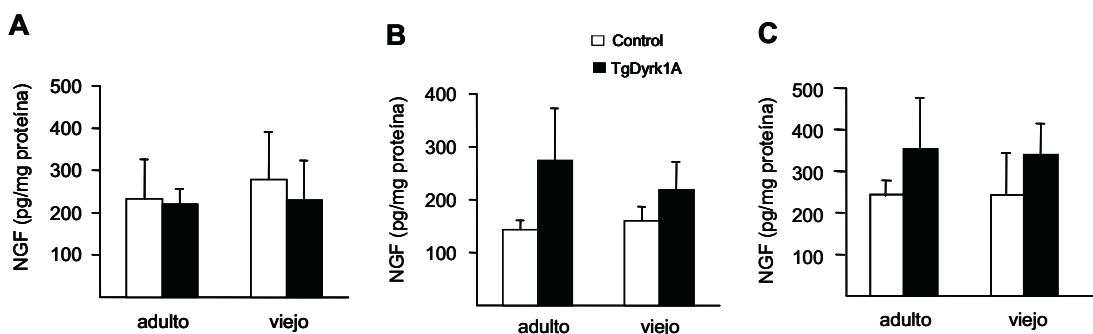


Figura 31. Efecto de la edad en la concentración de NGF libre en diferentes estructuras cerebrales en TgDyrk1A. Concentración de NGF expresada como pg por mg de proteína en el A) prosencéfalo basal, B) el hipocampo y C) la corteza frontal del modelo de sobreexpresión de Dyrk1A en dos cortes de edad diferente (5-7 animales por grupo). Los datos se expresan como media ± E.E.M.

2.5. El modelo de sobreexpresión de Dyrk1A presenta alteraciones en la neuritogénesis y afectación en la dinámica de la actina de las espinas dendríticas

En una patología neurodegenerativa de las características del SD, es necesario conocer los factores estructurales y funcionales que pueden constituir elementos predisponentes de la neurodegeneración asociada a la edad. Más aún, con toda probabilidad los elementos celulares y los procesos de neuroplasticidad que se encuentran alterados durante el neurodesarrollo, también lo estarán en el adulto o determinarán las alteraciones funcionales del envejecimiento en estos pacientes. Por ello hemos abordado el estudio de los mecanismos celulares en una estructura que muestra alteraciones significativas tanto en el SD como en nuestro modelo transgénico, como es la corteza cerebral. Para este estudio hemos utilizado un modelo experimental *in vitro* que permite estudiar los procesos de neuritogénesis: el cultivo primario.

2.5.1. Caracterización de la neuritogénesis en el ratón TgDyrk1A

La neuritogénesis se caracterizó mediante la reconstrucción gráfica de neuronas transfectadas con GFP provenientes de cultivos corticales primarios (ver *métodos*). Los resultados se muestran en la Tabla 6. El análisis de la microarquitectura de las células en el cultivo primario no reveló diferencias en el área del soma neuronal o en el número total de dendritas.

Análisis morfométrico del axón

El estudio de la morfología del axón mostró una tendencia a una reducción de la longitud en los cultivos TgDyrk1A (efecto de genotipo, $P = 0.1$, test de U Mann-Whitney), y a presentar mayor número de ramificaciones (efecto genotipo, $P = 0.1$, test de U Mann-Whitney) sin que estas diferencias resultaran significativas. La reducción de la longitud del axón dependía de una reducción de los segmentos terminales del axón (efecto de genotipo, $P < 0.05$, test de U Mann-Whitney) sin cambios significativos en la longitud de los segmentos intermedios (efecto de

genotipo, $P = 0.1$, test de U Mann-Whitney). El número de segmentos terminales no varió entre ambos genotipos.

El análisis de la morfología de los filopodios presentes a lo largo del axón reveló que éstos eran más cortos en el ratón TgDyrk1A (efecto de genotipo, $P < 0.005$, test de U Mann-Whitney) siendo su densidad significativamente superior en las neuronas de animales transgénicos (efecto de genotipo, $P < 0.05$, test de U Mann-Whitney).

Análisis morfométrico de las dendritas

Al analizar la morfología de las dendritas se observó que el tamaño medio de éstas era similar en ambos genotipos y que presentaban un número parecido de segmentos terminales sin diferencias de tamaño. Por el contrario, la longitud de los segmentos intermedios resultó menor en las neuronas provenientes del animal TgDyrk1A comparado con sus respectivos controles (efecto de genotipo, $P = 0.08$, test de U Mann-Whitney)

Por otro lado, al igual que ocurría en el axón, en las dendritas del TgDyrk1A los filopodios resultaron más cortos (efecto de genotipo, $P < 0.005$, test de U Mann-Whitney) y aunque eran ligeramente más numerosos, la densidad era significativamente mayor en estos animales (efecto de genotipo, $P < 0.01$, test de U Mann-Whitney).

Caracterización de los conos de crecimiento

No se observaron diferencias de genotipo en el número ni el área de los conos de crecimiento (efecto de genotipo, $P = 0.19$, test de U Mann-Whitney) pero la densidad de conos fue significativamente superior en el TgDyrk1A (efecto de genotipo, $P < 0.05$, test de U Mann-Whitney).

Tabla 6. Caracterización del proceso de neuritogénesis en ratón TgDyrk1A

	Control	TgDyrk1A
Área del soma (μm^2)	133.38 \pm 15.89	126.60 \pm 15.89
Número de ramificaciones	15.31 \pm 1.11	14.22 \pm 1.05
AXÓN		
Longitud media del axón (μm)	1925.41 \pm 130.48	1652.05 \pm 96.33
Número de puntos de ramificación	29.23 \pm 2.74	32.47 \pm 2.25
Número de segmentos terminales	33.44 \pm 3.07	34.77 \pm 2.48
Longitud media de segmentos terminales (μm)	30.46 \pm 3.78	19.73 \pm 1.80 *
Longitud media de segmentos intermedios (μm)	60.94 \pm 9.06	42.13 \pm 4.39
Número de filopodios	59.19 \pm 7.37	66.98 \pm 7.15
Longitud de filopodios (μm)	2.18 \pm 0.07	1.87 \pm 0.07 ***
Densidad de filopodios (número/ μm)	0.03 \pm 0.003	0.04 \pm 0.003 *
DENDRITA		
Longitud media de las dendritas (μm)	322.13 \pm 25.05	310.97 \pm 30.08
Número de puntos de ramificación	0.85 \pm 0.06	1.1 \pm 0.10
Número de segmentos terminales	2.60 \pm 0.14	2.71 \pm 0.18
Longitud media de segmentos terminales (μm)	7.97 \pm 0.44	7.33 \pm 0.31
Longitud media de segmentos intermedios (μm)	2.16 \pm 0.34	2.11 \pm 0.19
Número de filopodios	1.84 \pm 0.16	2.17 \pm 0.21
Longitud de filopodios (μm)	1.84 \pm 0.16	1.51 \pm 0.05 ***
Densidad de filopodios (número/ μm)	0.05 \pm 0.003	0.07 \pm 0.005 **
CONO DE CRECIMIENTO		
Número	2.47 \pm 0.28	3.18 \pm 0.38
Longitud (μm)	3.34 \pm 0.44	3.31 \pm 0.28

Neuritogénesis en el ratón TgDyrk1A (control n = 39; TgDyrk1A n = 44). Los datos se expresan como mediana \pm rango intercuartil.

2.5.2. Estudio de la dinámica de la actina en las espinas dendríticas del ratón TgDyrk1A

Los cambios en la morfología de las espinas relacionados con plasticidad sináptica, dependen de modificaciones dinámicas del citoesqueleto de actina presente en las espinas dendríticas. Mediante experimentos de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) se analizaron parámetros relacionados con los cambios dinámicos en la actina de las espinas dendríticas de cultivos corticales del modelo de sobreexpresión de Dyrk1A tranfectados con GFP-actina. Se observó que la fracción de fluorescencia que se recupera (fracción móvil), la cual representa la difusión de nuevos monómeros de actina que se incorporan a la espina, y por tanto, el recambio de éstos, era significativamente menor en el ratón TgDyrk1A (efecto de genotipo, $P < 0.05$, ANOVA) (Figura 32A). Por otro lado, la difusión de actina en las espinas transgénicas resultó más rápida que en las espinas controles como indica la reducción en el tiempo medio de recuperación de la fluorescencia (efecto de genotipo, $P < 0.05$, ANOVA) (Figura 32B).

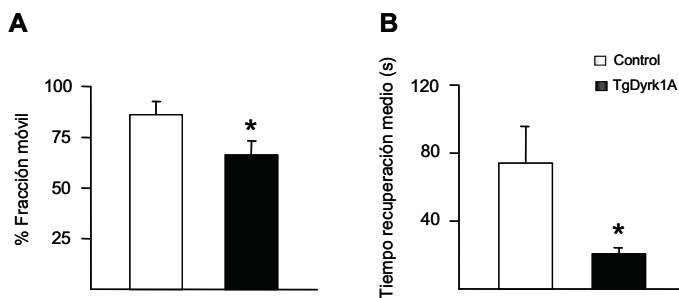


Figura 32. Experimentos de FRAP en espinas dendríticas de cultivos corticales del ratón TgDyrk1A. Representación de A) el porcentaje de fracción móvil de actina en las espinas y B) el tiempo medio de recuperación de la actina hasta niveles estables (control n = 17; TgDyrk1A n = 17). Los datos se expresan como media \pm E.E.M. Diferencias entre genotipos * $P < 0.05$.

2.6. El enriquecimiento ambiental no produjo efectos beneficiosos en el modelo de sobreexpresión de Dyrk1A

Dado que la adaptación al entorno es precisamente una de las funciones alteradas en el retraso mental y los procesos neurodegenerativos, y que requiere de la integridad de los procesos de neuroplasticidad para producir sus efectos, evaluamos la repercusión de la exposición a un entorno enriquecido en el modelo TgDyrk1A,

2.6.1. Efecto del enriquecimiento sobre la actividad exploratoria en el ratón TgDyrk1A

La prueba de la tabla de agujeros se utilizó para evaluar la actividad exploratoria tras la exposición al enriquecimiento ambiental. En los machos la actividad exploratoria no mostró cambios significativos tras enriquecimiento en ninguno de los genotipos, como indicó la ausencia de diferencias en el número de exploraciones, el tiempo total de exploración y la duración media de exploración (Figura 33). Sin embargo, las hembras control enriquecidas realizaron una duración media de exploración y un tiempo total mayor que las controles no enriquecidas (efecto de tratamiento, $P < 0.05$, ANOVA) (Figura 33A y 33B). Por el contrario, en las ratonas TgDyrk1A no se pudo observar este incremento significativo en la actividad exploratoria como consecuencia del enriquecimiento ambiental. Además, las hembras TgDyrk1A estabuladas en condiciones estándar realizaron un mayor número de exploraciones con respecto a las hembras control (efecto de genotipo, $P < 0.05$, ANOVA), parámetro que no se modificó por el enriquecimiento ambiental, mientras que en las hembras control se observó un incremento en el número de exploraciones, aunque sin alcanzar la significación (efecto de genotipo, $P = 0.06$, ANOVA) (Figura 33C).

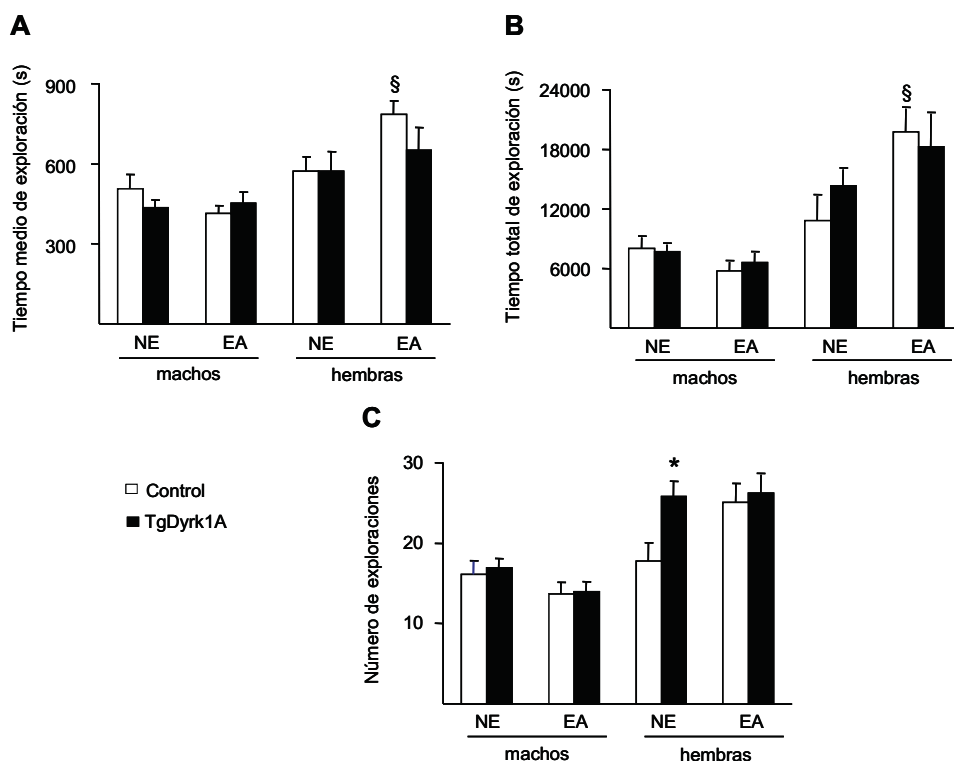


Figura 33. Efecto del enriquecimiento en la actividad exploratoria en el ratón TgDyrkA. Representación de A) la duración media de exploración, B) el tiempo total de exploración y C) el número de exploraciones realizadas en la tabla de agujeros en el ratón TgDyrk1A tras el enriquecimiento ambiental (MACHOS: control no enriquecido: n = 9; TgDyrk1A no enriquecido: n = 21; control enriquecido: n = 11; TgDyrk1A enriquecido: n = 10; HEMBRAS: control no enriquecido: n = 7; TgDyrk1A no enriquecido: n = 10; control enriquecido: n = 13; TgDyrk1A enriquecido: n = 9). Los datos se expresan como media ± E.E.M. Diferencias entre genotipos * $P < 0.05$. Diferencias entre condiciones de estabulación en un mismo genotipo § $P < 0.05$.

2.6.2. Efecto del enriquecimiento sobre el aprendizaje y la memoria visuo-espacial en el ratón TgDyrk1A

Empleando el laberinto acuático de Morris se analizó el efecto producido por la estabulación en condiciones de enriquecimiento ambiental sobre la memoria visuo-espacial. Durante la sesión de entrenamiento no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados: latencia de llegada a la plataforma (Figura 34A), distancia recorrida (Figura 34B) y velocidad de natación (Figura 34B), indicando que el procedimiento fue adquirido de manera similar en los 4 grupos de estudio.

Al analizar el efecto del enriquecimiento en los animales control, durante las sesiones de adquisición se observó una mejor ejecución de la tarea en los animales control no sometidos al enriquecimiento (efecto de tratamiento, $P < 0.05$, ANOVA de medidas repetidas) (Figura 34A) mientras que los animales control enriquecidos presentaron latencias de escape significativamente mayores durante la primera sesión de adquisición (efecto de tratamiento, $P < 0.05$, ANOVA) y su velocidad de natación fue más lenta (efecto de tratamiento, $P = 0.059$, ANOVA de medidas repetidas) (Figura 34C). Sin embargo, el porcentaje de reducción de la latencia entre la primera y la última sesión de adquisición, era similar en ambos casos (control no enriquecido: 39.08%, control enriquecido: 41.16%). No se observaron diferencias importantes en la distancia recorrida (Figura 34B).

En los animales transgénicos, el enriquecimiento no produjo cambios en la curva de aprendizaje (efecto de tratamiento, $P = 0.72$, ANOVA de medidas repetidas), pero el análisis del porcentaje de reducción de la latencia entre la primera y la última sesión indicó que el aprendizaje en los animales TgDyrk1A enriquecidos no resultó tan eficaz en comparación con el resto de los grupos (TgDyrk1A no enriquecidos: 32.84%, TgDyrk1A enriquecidos: 11.21%), sugiriendo que el enriquecimiento tuvo un efecto negativo en ratones macho, más acusado en los animales TgDyrk1A. En el caso de los animales transgénicos no se observaron diferencias importantes ni en la distancia recorrida (Figura 34B) ni en la velocidad de natación (Figura 34C).

Resultados

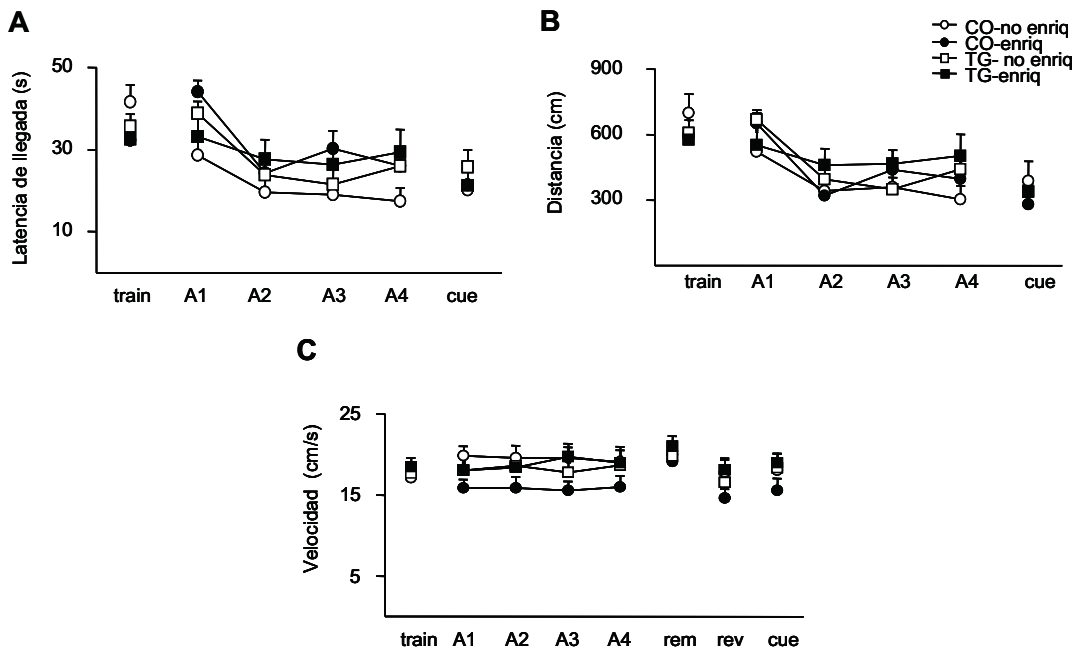


Figura 34. Estudio del efecto del enriquecimiento ambiental sobre la memoria visuo-espacial en ratones TgDyrk1A macho. Representación de A) la latencia de llegada a la plataforma, B) la distancia recorrida y C) la velocidad de natación en las sesiones de entrenamiento (train), adquisición (A1, A2, A3, A4), aprendizaje guiado (cue), retirada de la plataforma (rem) y cambio de posición de la plataforma (rev) en el modelo de sobreexpresión de Dyrk1A tras enriquecimiento ambiental (control no enriquecido n = 8; control enriquecido n = 15; TgDyrk1A no enriquecido n = 20; TgDyrk1A enriquecido n = 13). Los datos se expresan como media \pm E.E.M.

En un estudio preliminar realizado con hembras, se observó que la curva de adquisición en los animales control era ligeramente mejor que la obtenida en las ratonas transgénicas. Además, mientras que en los controles, el enriquecimiento ambiental pudo tener efectos beneficiosos, en los animales transgénicos no se apreciaron diferencias en la ejecución de la prueba independientemente de las condiciones de estabulación. A pesar de que estos datos resultan preliminares debido al escaso número de animales empleado, apuntan hacia una mejora en el aprendizaje visuo-espacial como consecuencia del enriquecimiento en las hembras control, siendo menos evidente en las hembras transgénicas. A diferencia que en los machos, en las ratonas hembras no se observaron diferencias en la velocidad de natación (Figura 35B).

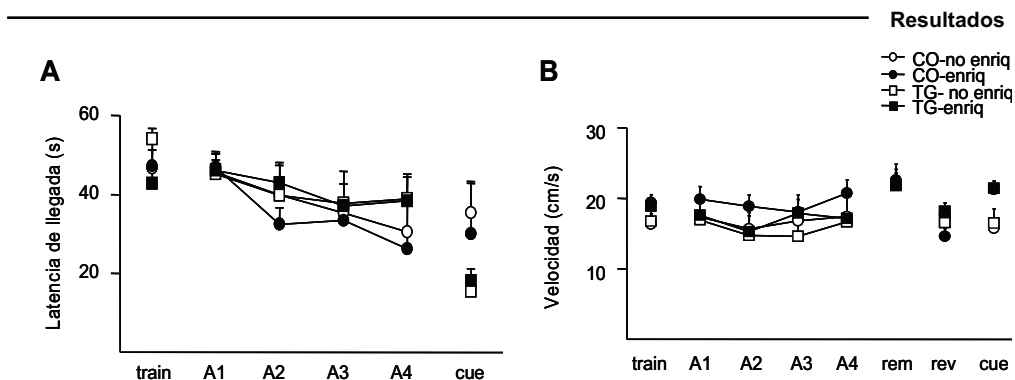


Figura 35. Estudio del efecto del enriquecimiento ambiental sobre la memoria visuo-espacial en ratones TgDyrk1A hembra. Representación de A) la latencia de llegada a la plataforma y B) la velocidad de natación en las sesiones de entrenamiento (train), adquisición (A1, A2, A3, A4), aprendizaje guiado (cue), retirada de la plataforma (rem) y cambio de posición de la plataforma (rev) en el modelo de sobreexpresión de Dyrk1A tras enriquecimiento ambiental (control no enriquecido $n = 5$; control enriquecido $n = 10$; TgDyrk1A no enriquecido $n = 6$; TgDyrk1A enriquecido $n = 8$). Los datos se expresan como media \pm E.E.M.

En los animales no sometidos al enriquecimiento ambiental se observó una afectación en la memoria de referencia en sesión de retirada de la plataforma en los animales TgDyrk1A, reflejada en la menor permanencia en el cuadrante entrenado en comparación con sus respectivos controles (efecto de genotipo, $P = 0.05$, ANOVA). En el caso de los animales enriquecidos esta diferencia no resultó tan evidente, en parte debido a que los animales control enriquecidos mostraron una tendencia al empeoramiento de su ejecución. En el estudio preliminar realizado en hembras no reveló cambios en la memoria de referencia como consecuencia del enriquecimiento ambiental (Tabla 7).

El análisis de la sesión de cambio de posición de la plataforma no mostró diferencias en flexibilidad cognitiva en el animal TgDyrk1A con respecto a los controles. Además el enriquecimiento no mejoró esta capacidad en ninguno de los dos genotipos. En hembras tampoco se observaron diferencias en este parámetro (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto del enriquecimiento en la memoria visuo-espacial y la flexibilidad cognitiva en el ratón TgDyrk1A

	Sin Enriquecimiento		Enriquecimiento	
	Control	TgDyrk1A	Control	TgDyrk1A
Macho				
Sesión de retirada de plataforma	41.12 ± 2.82	30.01 ± 3.36 *	34.38 ± 2.36	33.33 ± 4.62
Sesión de cambio de posición de plataforma	10.71 ± 1.71	11.61 ± 2.12	11.65 ± 2.51	14.93 ± 2.46
Hembra				
Sesión de retirada de plataforma	26.86 ± 4.82	28.64 ± 3.04	21.17 ± 3.36	24.16 ± 5.21
Sesión de cambio de posición de plataforma	39.17 ± 10.05	30.94 ± 11.31	27.39 ± 8.19	27.02 ± 9.91

Porcentaje de tiempo en el cuadrante entrenado en la sesión de retirada de la plataforma y en el cuadrante nuevo en la sesión de cambio de plataforma en el ratón TgDyrk1A (Machos: control no enriquecido n = 8; control enriquecido n = 15; TgDyrk1A no enriquecido n = 20; TgDyrk1A enriquecido n = 13; Hembras: control no enriquecido n = 5; control enriquecido n = 10; TgDyrk1A no enriquecido n = 6; TgDyrk1A enriquecido n = 8). Los datos se expresan como media ± E.E.M. Diferencias entre genotipos * $P < 0.05$.

2.6.3. Efecto del enriquecimiento sobre la memoria reciente en el ratón TgDyrk1A

En la prueba de la evitación pasiva, aunque durante las dos sesiones de entrenamiento no se observó que el enriquecimiento afectara a la latencia de descenso de la plataforma, si modificó significativamente la ejecución de la tarea a las 24 horas. Los TgDyrk1A enriquecidos mostraron un incremento en la latencia de bajada de la plataforma significativamente menor respecto a los animales control enriquecidos y TgDyrk1A no enriquecidos ($P < 0.05$ en ambos casos, test de U Mann-Whitney). La re-exposición una semana después mostró una tendencia al deterioro en los transgénicos enriquecidos con respecto a los controles estabulados en las mismas condiciones (efecto de genotipo, $P = 0.07$, test de U Mann-Whitney) (Figura 36).

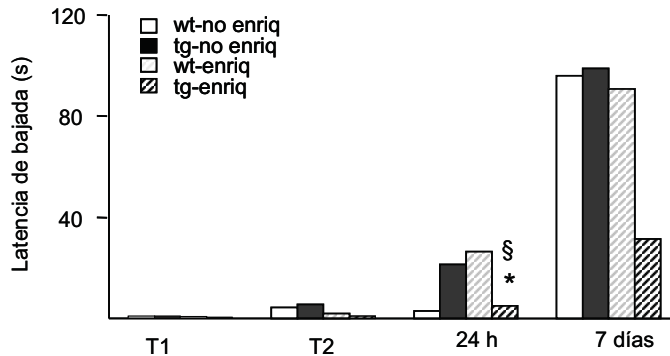


Figura 36. Efecto del enriquecimiento sobre la memoria reciente en el ratón TgDyrk1A. Representación de la latencia de bajada de la plataforma en las diferentes sesiones (T1 y T2: entrenamiento, a las 24 horas y a los 7 días) en la prueba de evitación pasiva (control no enriquecido $n = 12$; control enriquecido $n = 13$; TgDyrk1A no enriquecido $n = 14$; TgDyrk1A enriquecido $n = 16$). Los datos se expresan como mediana. Diferencias entre genotipos * $P < 0.05$, diferencia de un mismo genotipo sometido a diferente tratamiento § $P < 0.05$.

2.6.4. Incremento de la actividad metabólica cerebral como consecuencia del enriquecimiento ambiental

Una vez finalizadas las pruebas conductuales, la actividad metabólica basal cerebral de los animales sometidos a enriquecimiento fué analizada en el microPET. Tras la administración intravenosa de FDG¹⁸, se observó un incremento en la actividad metabólica posiblemente como consecuencia de los cambios cerebrales producidos por el enriquecimiento, sin embargo no se apreciaron diferencias entre genotipos (Figura 37).

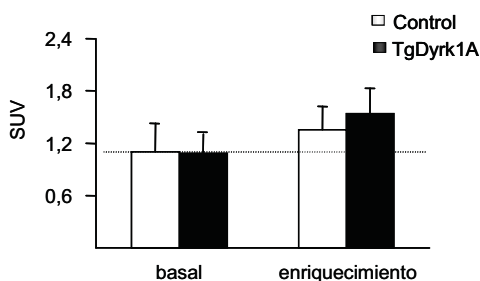


Figura 37. MicroPET tras el enriquecimiento ambiental en animales TgDyrk1A. Cuantificación de la actividad metabólica tras el enriquecimiento ambiental. Los datos se expresan como media \pm E.E.M.

DISCUSIÓN



Esta Tesis se ha desarrollado en el contexto de un proyecto más amplio cuyo objetivo es avanzar en la caracterización funcional de genes candidatos para SD y sus productos génicos y su repercusión funcional y patológica. Hemos centrado el trabajo en el envejecimiento prematuro que se observa en los pacientes con SD y que ha sido propuesto como un modelo para estudiar estadios pre-demenciales de EA debido a la elevada prevalencia (Prasher 1995), y sobretodo a la temprana instauración de los rasgos neuropatológicos de EA en pacientes con SD. Sin embargo es necesario considerar que en el SD durante el desarrollo postnatal se produce un proceso degenerativo a nivel neuronal, que podría incrementar la vulnerabilidad del cerebro de SD contribuyendo posiblemente a la instauración temprana de la EA. Por ello, en el SD cualquier cambio relacionado con la edad se superpone a las modificaciones ocurridas durante el desarrollo, lo que dificulta el estudio del proceso neurodegenerativo. Las similitudes existentes entre SD y EA, sugieren la participación de factores predisponentes o patogénicos de la EA entre algunos genes presentes en la región crítica para SD (DSCR). Como se ha expuesto en la Introducción, Dyrk1A podría ser un buen candidato para explicar las alteraciones cerebrales observadas en el SD, dada su participación fisiológica en diferentes aspectos del neurodesarrollo, como la proliferación, la formación de conexiones neurales y la remodelación de éstas. En este trabajo se demuestra que la disregulación de los niveles de expresión de este gen tiene además consecuencias patogénicas durante periodos más tardíos, y que su sobreexpresión está implicada en las alteraciones cognitivas y conductuales y los procesos neurodegenerativos asociados a la edad que se observan en las personas con SD.

La primera consecuencia de la trisomía 21 es el incremento proporcional de la expresión génica en un 50%, lo que ha llevado a proponer un efecto de dosis génica. Por tanto, la generación de modelos de aneuploidía ha de garantizar que el grado de desequilibrio de la expresión sea similar, como sucede en nuestros modelos. Sin embargo, este efecto de dosis génica no siempre es proporcional a nivel traduccional de manera que los niveles de proteína aumenten correlativamente con la dosis génica. Más aún cuando se trata de una quinasa muy posiblemente implicada en diversas vías de señalización celular, y que además puede actuar como factor de transcripción, como es el caso de Dyrk1A, el resultado del cambio

de dosis puede ser la disregulación (por exceso o por defecto) de la transcripción de genes diana situados en diferentes cromosomas o la modulación de ciertas vías de señalización. Todo ello hace difícil predecir y establecer la relación entre el genotipo y el rasgo fenotípico, porque el fenotipo observado no es sólo el resultado directo de modificaciones en un gen determinado sino que también, de las modificaciones que secundariamente ocurran a nivel del transcriptoma y del proteoma.

Una segunda consideración importante se refiere al fondo genético de las cepas utilizadas, cuya disparidad podría determinar en cierta medida diferencias en el impacto de desequilibrio de dosis génica. Por tanto, en la interpretación de los resultados, se ha de tener en cuenta que el fenotipo se puede ver modificado no solamente por el cambio de expresión de *Dyrk1A*, sino por el contexto genético en el que dicho cambio se produce. En nuestro trabajo, no se han utilizado ratones congénicos, una estrategia que consigue, mediante retrocruzamientos, homogenizar el fondo genético del modelo, sino ratones procedentes de sucesivos cruces que diluyen, en cierta medida, la influencia de éste, pero incrementan la variabilidad interindividual. Este factor por un lado constituye una desventaja, dado que requiere la utilización de grupos más grandes de animales para poder extraer conclusiones funcionales, pero por otro lado presenta la ventaja de que los fenotipos, cuando son observables, son posiblemente más relevantes en la patología humana, que nunca presenta las características de homogeneidad genética de una cepa congénica. Sin embargo, conviene recordar la importancia de factores epigenéticos en la definición del fenotipo, que determina en nuestro caso la dificultad para comparar directamente el fenotipo de los modelos transgénico y heterocigoto, debido a la gran diferencia entre la procedencia genética de las cepas utilizadas en esta Tesis Doctoral cuyo origen reside en aspectos metodológicos asociados a la propia generación del modelo y determina por sí misma diferencias claras en los patrones conductuales, aspectos estructurales, bioquímicos, o moleculares. Más aún, la reducción de dosis y la sobreexpresión pueden estar influyendo de forma muy diferente y con distinta intensidad sobre el fenotipo.

En nuestro trabajo la evaluación neurológica y comportamental de los modelos de *Dyrk1A* reveló un deterioro asociado a la edad en diferentes ámbitos funcionales. A pesar de que en los resultados no se han analizado explícitamente la comparación

de las dos cepas de origen (C57/129 para Dyrk1A^{+/-} y C57/SJL para TgDyrk1A), la cepa de referencia del modelo de haploinsuficiencia de Dyrk1A mostró un deterioro más acusado. Con la edad, tanto los ratones heterocigotos como de genotipo salvaje presentaron alteraciones en la capacidad visual, la nocicepción, la respuesta de sobresalto y en el sistema vestibular mientras que las alteraciones presentes en la cepa de origen del modelo transgénico fueron menos importantes, observándose únicamente una menor respuesta de sobresalto en el envejecimiento. Resulta importante tener en consideración las alteraciones detectadas en el análisis conductual, ya que las pruebas utilizadas requieren la integridad de varios sistemas y elementos estructurales, aunque en casi todos se evalúe una función predominante. Así, trastornos del equilibrio, la coordinación motora o la visión, pueden afectar la realización de varias de las pruebas a las que se somete a los animales.

A efectos de esta discusión, y considerando estas limitaciones conceptuales, no hemos comparado directamente los fenotipos obtenidos en los dos modelos experimentales, y se considera que el estudio del modelo haploinsuficiente aporta datos en lo referente al papel fisiológico del gen, ya que aquellas funciones que requieran la dosis adecuada del gen se verán alteradas, mientras que el modelo de sobreexpresión, en el que se inserta una o varias copias en exceso de un gen normal, se utiliza para analizar estudiar la posible relevancia del desequilibrio de dosis de Dyrk1A, y por tanto el impacto patogénico de ésta en SD.

1. PERFIL DEL DETERIORO COMPORTAMENTAL ASOCIADO A LA EDAD EN MODELOS DE MODIFICACIÓN DE EXPRESIÓN DE DYRK1A

El análisis de los modelos de haploinsuficiencia y sobreexpresión de Dyrk1A ha revelado alteraciones sensoriales, motoras y cognitivas asociadas con el envejecimiento producidas por cambios sutiles en los niveles de expresión de Dyrk1A. Estas alteraciones en su mayor parte se refieren a los dominios funcionales motores, mientras que el deterioro de las funciones cognitivas asociado a la edad se vio menos modificado por el cambio de dosis génica. En esta discusión se analizan fundamentalmente aspectos motores y cognitivos, dominios funcionales

que sufren un claro deterioro con la edad y que en trabajos previos se ha sugerido que podrían estar relacionados con la alteración dosis dependiente de la expresión de Dyrk1A.

1.1. Alteraciones neurológicas y su deterioro asociado a la edad

El primer paso en la caracterización fenotípica de un modelo es la evaluación de elementos que pueden influir en los experimentos conductuales de los que pretendemos extraer conclusiones acerca de funciones más complejas como la función motora o determinados aspectos cognitivos. Estos experimentos permitieron descartar o tener en consideración posibles artefactos durante la evaluación neuroconductual. Uno de los más obvios al abordar el perfil neurodegenerativo es analizar el deterioro neurológico. Para ello se realizan baterías de pruebas generales que permiten la evaluación de aspectos sensoriales, motores y reflejos.

1.1.1. Dyrk1A +/-

La evaluación del patrón de deterioro neurológico asociado a la edad en el ratón Dyrk1A+/- no mostró diferencias importantes con sus respectivos controles, observándose alteraciones específicas de fuerza muscular y de la marcha en los ratones heterocigotos adultos.

El sentido del equilibrio sufre un deterioro importante con el envejecimiento (Lopez et al. 1997). El equilibrio está gobernado por los sistemas visual, propioceptivo y vestibular, de forma que la inadecuada recepción de la información propioceptiva, la falta de compensación mediante el sistema visual o alteraciones específicas del sistema vestibular pueden afectar la capacidad de ejecución de pruebas de equilibrio como la barra elevada o el rodillo giratorio. En nuestros experimentos no se observaron alteraciones en el equilibrio en el ratón Dyrk1A+/- durante la etapa adulta, y la alteración asociada a la edad se hizo patente en ambos genotipos, si bien afectó en mayor grado a la actividad que al equilibrio. Estos resultados indican que ni el equilibrio ni su patrón de deterioro asociado a la edad se ven afectados por la reducción de dosis de Dyrk1A.

Las alteraciones de tono muscular, o coordinación motora se observan en enfermedades que afectan al cerebelo o la neurona motora, regiones ambas en las que Dyrk1A se expresa en el animal adulto. Estas alteraciones influyen en la capacidad de realizar pruebas de fuerza o de coordinación motora. En el ratón Dyrk1A^{+/-} se observa una peor ejecución de la prueba de fuerza que se acentúa con la edad, de forma que los ratones heterocigotos adultos caían antes que sus respectivos controles, mientras que el número de desplazamientos y la latencia de llegada al extremo de la percha no estaban alterados. Estos resultados indican una afectación del tono muscular y no de la coordinación motora, que se corrobora por la falta de diferencias en el rodillo giratorio, una prueba que evalúa de forma más específica la coordinación motora. Con el envejecimiento se observó en ambos genotipos un empeoramiento en la ejecución de la prueba de la percha, mucho más marcado en Dyrk1A^{+/-}. Sin embargo, no se observó un deterioro asociado a la edad en la prueba de rodillo giratorio, indicando nuevamente que las diferencias observadas en la prueba de la percha posiblemente vienen determinadas por un problema de tono o fuerza muscular más que por alteraciones en la coordinación.

Las alteraciones de la marcha pueden evaluarse en los ratones mediante el análisis del patrón de las pisadas evidenciadas con tinta sobre una tira de papel. Los trastornos de la marcha pueden originarse por afectación del cerebelo, los ganglios basales o la corteza cerebral que ocasionan trastornos de la integración a nivel central, y al igual que el resto de las alteraciones motoras, sufre un declive con la edad. La marcha de los ratones Dyrk1A^{+/-} se caracteriza por un componente multifactorial que incluye un tiempo de reacción prolongado, pasos más cortos y bradicinesia, una vez efectuada la corrección por tamaño ya que los ratones heterocigotos son más pequeños. Este patrón se observa en modelos con alteraciones dopaminérgicas del sistema nigroestriatal (Fernagut et al. 2003), que también se observan en nuestro modelo, como se discute más abajo, siendo un índice de la disfunción de los ganglios basales. Estos resultados sugieren que Dyrk1A estaría implicado de forma fisiológica en la funcionalidad de sistemas motores con repercusión en aspectos concretos, sin que podamos descartar su implicación en la función cerebelar, ya que mecanismos compensatorios podrían estar enmascarando tales deficiencias.

1.1.2. TgDyrk1A

Físicamente, entre las personas con SD se suele dar cierta torpeza motora, tanto gruesa (brazos y piernas) como fina (coordinación ojo-mano). Presentan lentitud en sus realizaciones motrices y mala coordinación en muchos casos (Florez 1992; Cuskelly et al. 2002). Destacan la hipotonía muscular observada durante la infancia, pese a que ha sido cuestionada en diversas ocasiones, el deficiente funcionamiento del sistema vestibular, la afectación de la fuerza muscular, hiperlaxitud ligamentosa y diversas complicaciones en la transmisión informativa de los circuitos cerebro-cerebelosos (Davis y Kelso 1982; Morris et al. 1982; Palisano et al. 2001; (Robertson Ringenbach et al. 2002). Además, existe un retraso en la adquisición de la destreza motora fina y gruesa, con afectación de la realización de movimientos específicos, fundamentalmente los movimientos alternantes, aspectos que pueden ir modificándose con la edad (Robertson Ringenbach et al. 2002; Nadel 2003; Gemus et al. 2001). En concreto, el modelo de sobreexpresión muestra algunas alteraciones con alta similitud con las observadas tanto en pacientes con SD como en los modelos trisómicos de esta patología.

En el SD el sistema vestibular se encuentra afectado provocando déficit acusados en el equilibrio, especialmente durante las primeras etapas de vida del individuo (Vázquez 2001). En nuestros experimentos la sobreexpresión de Dyrk1A no afectó a la realización de pruebas de equilibrio ni al deterioro propio de la edad que se manifiesta de igual manera en ambos genotipos. La falta de expresión de Dyrk1A a lo largo del sistema del equilibrio, junto con el hecho de que esta función esté intacta en el ratón heterocigoto y TgDyrk1A, sugiere que posiblemente este gen no se encuentra implicado en la integridad funcional del sistema vestibular. Por lo tanto, estos resultados permitirían descartar el impacto patogenético de la sobreexpresión de Dyrk1A sobre el equilibrio, aunque hemos de considerar los factores epigenéticos derivados del fondo genético que podrían ser modificadores de las consecuencias fenotípicas en este sistema.

En lo que se refiere a la reducción de la contractilidad y tono muscular, éste es precisamente uno de los elementos que afectan el desarrollo motor en el SD, que determina trastornos en la postura y/o en el alineamiento de las extremidades, retrasando la adquisición de las habilidades motoras. En el ratón TgDyrk1A estudios

previos describieron un retraso en el desarrollo neuromotor que podría estar relacionado en parte con un cierto grado de hipotonía (Altafaj et al. 2001). Sin embargo, no hemos detectado alteraciones de la fuerza muscular ni de su deterioro con la edad en el ratón transgénico, lo que podría interpretarse como consecuencia de la instauración de fenómenos compensatorios tras el periodo de desarrollo o bien de la falta de un papel patogénico de la sobreexpresión Dyrk1A, ya que el ratón con reducción de dosis presenta alteraciones en la fuerza muscular ya en el adulto que se acentúan con la edad, sugiriendo la participación fisiológica de este gen.

Las alteraciones de la coordinación motora en los pacientes con SD se han relacionado con una posible disfunción cerebelar derivada de los cambios morfológicos observados (Frith and Frith 1974). Tanto en pacientes con SD como en el modelo trisómico Ts65Dn, el cerebelo presenta una reducción significativa de tamaño como resultado de la disminución del número de neuronas de la capa granular interna (Aylward et al. 1997; Baxter et al. 2000), que en el animal trisómico se ha relacionado recientemente con alteraciones en las vías mitogénicas durante el desarrollo postnatal temprano (Roper et al. 2006). En el ratón TgDyrk1A previamente se habían descrito alteraciones en coordinación motora utilizando la prueba de la percha (Altafaj et al. 2001). En nuestros experimentos, si bien el análisis de la prueba del rotarod en TgDyrk1A adulto no mostró alteraciones en coordinación motora, los resultados obtenidos en la cinta giratoria, que requiere una mayor capacidad de integración motora, indican una marcada afectación de esta función. De hecho, utilizando el rotarod, mientras algunos autores han descrito severas alteraciones en coordinación motora en el ratón Ts65Dn (Costa et al. 1999), otros autores empleando un protocolo menos forzado no han apreciado disfunción alguna (Baxter et al. 2000). Si bien el análisis macroscópico del cerebelo del ratón TgDyrk1A no presenta alteraciones de tamaño ni de laminación, es necesario un estudio más detallado de esta estructura para poder descartar una alteración a nivel histológico, ya que, de hecho las células de Purkinje, principal fuente eferente de información del cerebelo, sobreexpresan Dyrk1A, y modificaciones funcionales en estas células se han relacionado con alteraciones en coordinación motora (Clark et al. 1997; Le Marec y Lalonde 1997). El envejecimiento, produjo un empeoramiento de la ejecución de la prueba del rotarod

en ambos genotipos, sugiriendo que la sobreexpresión a largo término de *Dyrk1A* no afecta el patrón de deterioro de la coordinación motora.

El deterioro de la marcha es uno de los primeros signos neurológicos del desarrollo de demencia en los pacientes adultos con SD (Prasher et al. 1995). El ratón TgDyrk1A no presenta alteraciones en este parámetro durante la etapa adulta, pero los animales transgénicos viejos realizaron menos pasos y con una zancada más larga comparados tanto con los controles como con la ejecución de la prueba durante la etapa adulta. La marcha en los pacientes con SD se desarrolla tardíamente y se caracteriza por patrones cinéticos anormales e inmaduros de la cadera y el tobillo (Carr 1970; Parker y Bronks 1980; Parker et al. 1986; Kubo y Ulrich 2006), debidos en parte a la hipotonía y la laxitud articular que afectarían a los biomecanismos de la marcha. De hecho el ratón TgDyrk1A presenta un claro retraso del desarrollo neuromotor durante el periodo postnatal, caracterizado por un retraso en la aparición de la locomoción y una persistencia de patrones motores inmaduros. El modelo trisómico Ts65Dn realiza pasos más cortos y con una capacidad de propulsión menor comparado con los animales euploides (Costa et al. 1999; Hampton et al. 2004) de manera similar a lo que ocurre en los pacientes jóvenes con SD (Parker y Bronks 1980). Estos datos, junto con el hecho de que el ratón heterocigoto presente alteraciones de la marcha sugieren que *Dyrk1A* podría estar implicado tanto en la regulación de los sistemas cerebrales implicados en la marcha a lo largo de la vida del animal, influyendo tanto en su desarrollo como en el proceso neurodegenerativo asociado al envejecimiento que los afecta. El patrón observado tanto en el modelo adulto de reducción de dosis como en el ratón transgénico viejo, apuntan a una posible participación del sistema dopaminérgico en estas alteraciones, tal como se discute más abajo. Es claro que la repercusión funcional de la reducción o el incremento de expresión de *Dyrk1A* no será la misma, pero posiblemente los sistemas afectados sí, de tal forma que posiblemente *Dyrk1A* es requerido en la dosis adecuada para el correcto desarrollo de las estructuras relacionadas con la marcha y su conectividad, pero el impacto fenotípico puede ser diferente en función de la dosis y también de la influencia del fondo genético.

1.1.3. El papel de Dyrk1A en las alteraciones neurológicas asociadas al envejecimiento

A pesar de que las distintas alteraciones descritas no están presentes en los dos modelos de expresión de *Dyrk1A*, posiblemente debido a acciones compensatorias, a un impacto diferencial de la procedencia genética, o a que las consecuencias de los cambios de dosis pueden ser diferentes si se trata de sobreexpresión o reducción de función, los resultados obtenidos implican a *Dyrk1A* en el control de diferentes funciones motoras como son el tono muscular, la coordinación motora, la marcha y la organización de las conductas motoras. Nuestros resultados permiten proponer que *Dyrk1A* es un gen dosis dependiente que debido a su acción sobre diferentes sustratos como los factores de transcripción, podría estar modulando el correcto funcionamiento de diferentes estructuras implicadas en la función motora que incluyen al cerebelo, corteza frontal, ganglios de la base y motoneuronas de la médula espinal. Aunque la mayoría de las alteraciones observadas son consecuencia de un desarrollo anormal que provoca retrasos importantes en la adquisición de habilidades motoras en estos modelos, nuestros experimentos sugieren que los cambios de expresión de *Dyrk1A* provocarían modificaciones a largo término relacionadas con el proceso neurodegenerativo acentuándose los fenotipos alterados existentes previamente.

1.2. Cambios en la actividad motora y su deterioro asociado a la edad

Las modificaciones de la actividad motora pueden depender de múltiples sistemas de tal forma que mutaciones en numerosos genes que se expresan en diferentes regiones relacionadas con la función motora y que alteran la funcionalidad de sistemas específicos de neurotransmisión pueden dar lugar a comportamientos motores aberrantes o modificar el nivel de actividad. La afectación de la actividad motora en el caso de *Dyrk1A* no resulta sorprendente ya que se ha descrito su expresión en varias estructuras cerebrales relacionadas con el control motor como cerebelo, la corteza cerebral o ganglios de la base y motoneuronas de la médula espinal (Marti et al. 2003).

En el análisis de la actividad motora se han de tener en cuenta las diferencias existentes entre cepas, ya que los fondos genéticos utilizados en este trabajo presentan índices de actividad diferentes. Numerosos trabajos han descrito diferencias marcadas en varios patrones de conducta de los ratones C57BL/6 cuando se comparan con otras cepas, principalmente DBA/2J y BALBc. En efecto, se han demostrado diferencias significativas en su actividad locomotora espontánea, en su mayor susceptibilidad y sensibilidad a los efectos de agonistas de la DA sobre la actividad locomotora horizontal y vertical. La cepa 129/J por el contrario, presenta un fenotipo hipoactivo mientras que la cepa SJL no muestra tendencia a la hipo o la hiperactividad marcadas, situándose en la zona central de la curva de Gauss (Voikar et al. 2001; Bothe et al. 2005). Por otra parte, se han demostrado diferencias en los niveles endógenos de DA así como en la densidad de receptores dopaminérgicos en diferentes áreas cerebrales y en la tasa de recambio de DA en dichas áreas, especialmente, cuando se comparan los ratones C57BL/6 con las cepas DAB/2J y BALBc (Ralph y Caine 2005). Por tanto el impacto del cambio de dosis de Dyrk1A puede estar influenciado por el fondo genético de los ratones.

Dyrk1A se expresa en el adulto en regiones cerebrales específicamente relacionadas con la función motora, lo que sugiere una implicación fisiológica de esta quinasa en la función motora en el adulto. Las alteraciones de actividad motora de ratones adultos en los modelos objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, ya habían sido descritas en estudios previos. Así, mientras los ratones Dyrk1A^{+/-} se caracterizan por su hipoactividad ante un entorno novedoso (Fotaki et al. 2002), los ratones TgDyrk1A muestran hiperactividad (Altafaj et al. 2001). En este trabajo se han profundizado en el nivel de análisis de las alteraciones motoras en los dos modelos de Dyrk1A objeto de estudio y hemos incidido en los cambios asociados a la edad.

1.2.1. Dyrk1A^{+/-}

Como hemos indicado, trabajos previos del laboratorio sugerían que la correcta dosis de Dyrk1A era necesaria para desarrollar un nivel de actividad normal. De hecho cuando se reduce la dosis como sucede en el modelo de haploinsuficiencia se produce un fenotipo hipoactivo, con afectación tanto del componente horizontal

como vertical (enderezamientos), si bien las observaciones publicadas sugerían que la alteración de la actividad en el adulto sólo se producía en condiciones de cierta aversividad como es la prueba de campo abierto en fase luminosa. Sin embargo, en esta Tesis se demuestra que los ratones *Dyrk1A*^{+/-} muestran también una marcada hipoactividad en un entorno no aversivo como las cajas de estabulación con una rueda de actividad. No obstante, debido a la falta de disponibilidad de animales adultos, este experimento no pudo realizarse en dos cortes de edad diferentes, por lo que no se puede afirmar que la reducción de actividad de este modelo sea inherente a él y no sólo este relacionado con condiciones estresantes durante la fase adulta.

1.2.2. Posible participación del sistema dopaminérgico en la hipoactividad de *Dyrk1A* +/-

La marcada hipoactividad que presenta el modelo de haploinsuficiencia de *Dyrk1A* junto con un patrón de la marcha que guarda cierta similitud al observado en la enfermedad de Parkinson, sugería la posibilidad de una alteración a nivel de la vía nigroestriatal. Cambios de la actividad motora espontánea se han atribuido en diferentes estudios a una hipoactividad dopaminérgica a diferentes niveles.

En nuestro modelo, el estudio estereológico mostró una reducción en el número de neuronas dopaminérgicas en SNc y en la celularidad total a nivel del estriado en el ratón *Dyrk1A*^{+/-}, lo que indica que la integridad de la vía nigroestriatal puede estar comprometida. Las alteraciones dopaminérgicas no son exclusivas de esta vía, ya que también se ha detectado una disminución del número de neuronas dopaminérgicas en VTA, que podrían ser responsables de cambios en la emotividad y en los sistemas de recompensa en nuestro modelo por alterar la vía mesocortical.

Posiblemente esta disminución de la celularidad condicionaba, a nivel estriatal, la reducción de la concentración del metabolito de dopamina (DOPAC) que se observa en el ratón *Dyrk1A*^{+/-} (experimentos realizados en el laboratorio del Dr F. Artigas, IDIBAPS). Ello podría ser debido a una disregulación de las enzimas metabolizantes (COMT y MAO), puesto que la concentración de dopamina (DA) tisular no estaba reducida y en estudios de microdiálisis realizados en el laboratorio del Dr. F. Artigas, la liberación basal de DA a nivel estriatal era similar en ambos

genotipos. Estos datos sugieren que la liberación y recaptación de DA podrían estar compensadas en el ratón heterocigoto a pesar de la reducción de celularidad. A falta de experimentos más sofisticados que permitan descartar alteraciones en la liberación espontánea de DA en el ratón *Dyrk1A^{+/-}*, los estudios de microdiálisis mostraron una liberación de dopamina significativamente menor en *Dyrk1A^{+/-}* tras la administración del agonista indirecto anfetamina que favorece la liberación de DA actuando a nivel vesicular y sobre la recaptación.

Por otro lado, la menor inhibición de la liberación de DA en el ratón *Dyrk1A^{+/-}* tras la administración de apomorfina (agonista D1/D2) y quinpirole (agonista D2) en experimentos de microdiálisis, indican que los mecanismos de autoregulación mediados por autoreceptores en las neuronas dopaminérgicas, podrían estar alteradas. Estos resultados sugieren alteraciones presinápticas tanto en los mecanismos vesiculares de liberación de DA como a nivel de los autorreceptores, posiblemente como consecuencia de la pobre inervación del estriado. Es posible que además existan alteraciones a nivel postsináptico como revelan los experimentos de catalepsia. El bloqueo de los receptores postsinápticos estriatelas D1, localizados en las neuronas estriatonigrales que proyectan directamente a la Sustancia Negra reticulata (SNr), y D2, que modulan la actividad de SNr por la vía indirecta a través del globus pallidus y el núcleo subtalámico, aumentan la inhibición tónica de los núcleos motores en el tálamo con la consiguiente inhibición de la actividad motora. El ratón *Dyrk1A^{+/-}* mostró una menor sensibilidad a la administración de dosis crecientes de los antagonistas de los receptores D1 (SCH-23390) y D2 (haloperidol), indicando una disfunción de las vías directa e indirecta que afectan al control motor. Posiblemente, los cambios postsinápticos se produzcan como una reacción compensatoria a las alteraciones presinápticas previamente descritas. Por lo que será necesario realizar en un futuro experimentos de autoradiografía y de unión a ligando para estudiar el estado funcional de estos receptores.

Finalmente, en el estudio de microPET (imagen in vivo) tras la administración intraperitoneal de anfetamina, la activación cerebral no resultó tan llamativa en el ratón *Dyrk1A^{+/-}* comparada con sus respectivos controles, posiblemente, y correlacionando este dato con los estudios de microdiálisis, debido a una menor

liberación de dopamina. Sin embargo, como la DA liberada por acción de la amfetamina actúa sobre los receptores dopaminérgicos, no se puede descartar que las alteraciones a este nivel también puedan contribuir a los cambios observados in vivo. Por desgracia, la falta de resolución del sistema para animales tan pequeños, no permite discriminar las áreas cerebrales que se están activando, lo cual facilitaría la aproximación a los mecanismos afectados en la transmisión dopaminérgica en nuestro modelo.

El conjunto de estos resultados sugiere que la carencia parcial de Dyrk1A desde el desarrollo afecta a la integridad del sistema dopaminérgico nigroestriatal, involucrando a Dyrk1A en el correcto funcionamiento de este sistema. Si se sigue el conjunto de influencias inhibitoras y estimuladoras del esquema de los ganglios basales, puede observarse como el resultado del déficit de dopamina estriatal es una relativa hiperactividad de la vía indirecta que produce una desinhibición funcional del núcleo subtalámico y por lo tanto del globo pálido interno. Esto causa una inhibición del tálamo y del córtex motor, lo que generaría la bradicinesia y la hipoactividad.

1.2.3. TgDyrk1A

Aparte de los diversos problemas específicamente motores que hemos discutido, los individuos con SD presentan un cierto grado de hiperactividad. Este fenotipo hiperactivo se observa también en los modelos de sobreexpresión de Dyrk1A, no solamente en el TgDyrk1A utilizado en este Tesis Doctoral, sino también en el ratón YAC152F7 que sobreexpresa Dyrk1A entre otros genes, y presenta hiperactividad durante el desarrollo (Branchi et al. 2004). Por otra parte, en varios modelos trisómicos se han observado cambios de actividad, como el ratón Ts65Dn o el ratón Ts1Cje caracterizados por hiper- e hipoactividad respectivamente (Escorihuela et al. 1995; Coussons-Read and Crnic 1996; Sago et al. 2000).

Hemos profundizado en el nivel de análisis de esta hiperactividad, empleando la prueba de análisis del patrón de natación. Cuando ésta se realizó en animales TgDyrk1A adultos, pudo detectarse un incremento en la actividad de tipo no linear caracterizada por un mayor número de paradas y tras éstas, un comienzo más rápido y un mayor número de cambios de dirección, mostrando un patrón de

natación más irregular y desorganizado que los controles. Este resultado sustenta la hipótesis de que TgDyrk1A podría presentar alteración a nivel de la corteza prefrontal afectando a la organización de la conducta motora, ya que no se trata únicamente de un incremento en actividad, sino de una actividad más errática, que posiblemente refleja alteraciones de atención y/o en la organización de la conducta emergente en nuestro modelo. Por tanto, la hiperactividad observada puede interpretarse como un fallo en el control inhibitorio y como consecuencia un incremento en la impulsividad (Kolb and Gibb 1990). En relación con la posible patogenicidad de la sobreexpresión de Dyrk1A, las personas con SD muestran hiperactividad durante los primeros años de vida, que se ha propuesto que podría estar relacionada con una disfunción cortical, por lo que podemos proponer que el exceso de dosis de Dyrk1A podría contribuir a este rasgo fenotípico, ya que su sobreexpresión en un entorno disómico produce un fenotipo similar.

Por otro lado, se estudió la influencia de la edad sobre la actividad locomotora en TgDyrk1A. Está descrito que con el envejecimiento se produce una disminución de la actividad locomotora del 50% con respecto a la edad adulta (revisado en Tou y Wade 2002) que algunos autores relacionan con una reducción de la densidad de receptores dopaminérgicos (Inoue y Nakata 2001). Como se ha indicado anteriormente, el sistema dopaminérgico está íntimamente relacionado con el control de la actividad motora a través de la modulación de la actividad de los ganglios basales, por lo que este sistema podría estar alterado en nuestro modelo. En el campo abierto, tanto los animales control como los TgDyrk1A mostraron una marcada reducción de la actividad horizontal con la edad, de tal forma que en los animales viejos TgDyrk1A quedó enmascarada la hiperactividad observada en la etapa adulta.

1.2.4. Posible participación del sistema dopaminérgico en la hiperactividad de TgDyrk1A

Dado que los resultados obtenidos en el heterocigoto sugieren que Dyrk1A es necesario para la integridad funcional del sistema nigroestriatal, era necesario explorar si el desequilibrio por sobreexpresión también modificaba la funcionalidad de este sistema. Sin embargo, los estudios estereológicos no revelaron cambios

relevantes en el número de neuronas dopaminérgicas en la SNpc, ni en la concentración de DA y su metabolito DOPAC a nivel estriatal (experimentos realizados en el laboratorio del Dr F. Artigas, IDIBAPS). Como consecuencia, tras la administración de anfetamina tanto el incremento de actividad locomotora como los resultados obtenidos de la microdiálisis, sugieren que la liberación de DA desde el terminal presináptico no estaría alterada por la sobreexpresión de Dyrk1A. Sin embargo, tras la administración del agonista apomorfinina la reducción de liberación de DA resultó significativamente menor en el ratón TgDyrk1A con respecto a los controles, sugiriendo cierta disregulación a nivel de los receptores dopaminérgicos, a pesar de que las diferencias en liberación de DA tras la administración del agonista selectivo D2 quinpirole no resultaron significativas entre ambos genotipos. Sin embargo, el ratón TgDyrk1A presentó una menor respuesta cataléptica tras el bloqueo de los receptores D2 apuntando no tanto a una posible disregulación a nivel de autoreceptores D2 sino más bien, a una alteración de los receptores D2 postsinápticos implicados en la vía indirecta relacionada con el control motor.

En cualquier caso, las diferencias a nivel nigroestriatal derivadas de la sobreexpresión de Dyrk1A son más sutiles que las que se producen cuando existe una carencia parcial de Dyrk1A. Este hecho indica que quizás la hiperactividad observada en el modelo transgénico no sea tanto debida a una disregulación en el sistema dopaminérgico sino más bien esté relacionada con alteraciones a nivel de la corteza prefrontal que conllevan a una desorganización de la conducta motora. Para esclarecer esta última premisa será necesario realizar experimentos conductuales de atención que a su vez permitirán dilucidar la participación de Dyrk1A en los problemas de atención de los niños con SD. Otro aspecto relevante es el aprendizaje motor en el que participan estructuras como cerebelo, corteza prefrontal y estriado, de forma que la mejoría en este tipo de aprendizaje se acompañan de cambios en la actividad y conectividad a nivel del estriado y la corteza motora (Topka et al. 1998; Costa et al. 2004). Aunque en el modelo de haploinsuficiencia de Dyrk1A no se observaron diferencias importantes, el ratón TgDyrk1A presentó un peor aprendizaje, sugiriendo nuevamente una posible alteración a nivel cerebelar y/o cortical.

1.2.4. El papel de Dyrk1A en la actividad motora y su deterioro asociado al envejecimiento

Nuestros resultados demuestran que los cambios de expresión de Dyrk1A producen alteraciones importantes en actividad locomotora. Los experimentos realizados en el heterocigoto muestran que la integridad del sistema dopaminérgico pueda estar alterada sugiriendo que éste podría ser el mecanismo patogenético implicado.

1.3. Aspectos emocionales

Aparte de las funciones propiamente motoras, se ha analizado la evolución de aspectos emocionales con la edad en el modelo de sobreexpresión de Dyrk1A. En el SD, debido a las alteraciones en el desarrollo del SN así como por las alteraciones a nivel neuroquímico (función adrenérgica y colinérgica), existe un freno en la expresión de los componentes emocionales, reguladores y madurativos del temperamento, así como en la capacidad de interpretación y de análisis. El propio retraso puede ejercer un efecto importante sobre la expresión de la emotividad.

En los ratones se utiliza como indicadores de la emotividad la conducta en pruebas en las que existe un conflicto entre la aversión natural de los roedores a los espacios abiertos y su tendencia a explorar nuevos ambientes (Treit et al. 1993), como el campo abierto o el laberinto en cruz elevado. TgDyrk1A, mostró un menor nivel de ansiedad en el campo abierto durante la etapa adulta reflejado en una mayor permanencia en la zona central, más aversiva. Sin embargo, en el laberinto elevado en cruz, las diferencias en ansiedad no fueron tan notorias siendo el número de entradas en brazos abiertos tan sólo levemente superior en los animales transgénicos. Estos datos sugieren que, posiblemente, los resultados obtenidos en el campo abierto estén más relacionados con la hiperactividad o las alteraciones en la actividad exploratoria presentes en este modelo, que con cambios en emotividad. Resultados similares han sido descritos en el ratón Ts65Dn que realizaba un mayor número de entradas en brazos abiertos que sus respectivos controles, relacionada con la impulsividad en ese modelo (Demas et al. 1996).

En cuanto a los cambios en ansiedad asociados a la edad, los datos bibliográficos resultan contradictorios existiendo autores que relacionan una disminución en los niveles de ansiedad con un incremento de la edad (Pisarska et al. 2000; Rowe et al. 1998; Darwish et al. 2001), mientras que otros observan un aumento de emotividad (Frussa-Filho et al. 1991; Boguszewski y Zagrodzka 2002; Bessa et al. 2005). Las diferencias en las condiciones de iluminación, la realización de otras pruebas conductuales previas, e incluso la cepa utilizada son algunos de los argumentos para explicar esta variedad de resultados. En nuestro modelo, en el animal control observamos una reducción del nivel de ansiedad con la edad, nuevamente más pronunciada en la prueba de campo abierto que en el laberinto en cruz, posiblemente reflejo de la reducción de la actividad motora. Sin embargo en el animal TgDyrk1A no se apreciaron cambios importantes en este parámetro, lo que puede ser interpretado como un efecto de la sobreexpresión de Dyrk1A sobre el nivel de ansiedad o sobre la actividad motora.

1. 4. Aspectos cognitivos y su deterioro con la edad

Tanto en humanos como en modelos murinos, el envejecimiento provoca un declive cognitivo progresivo como consecuencia de las alteraciones morfológicas y funcionales del circuito hipocampo-cortical (revisado en (Erickson and Barnes 2003). El envejecimiento patológico, propio de patologías demenciales, afecta de forma específica el almacén de memoria reciente que depende de la degeneración del sistema colinérgico del prosencéfalo basal. El estudio de la evolución de diferentes aspectos del aprendizaje y memoria con la edad solamente se realizó en el modelo de sobreexpresión de Dyrk1A, que mostró una afectación significativa de la memoria reciente, siendo menos acusado en la memoria visuo-espacial.

1.4.1. Memoria reciente

La valoración del deterioro cognitivo en pacientes con SD, es compleja debido a la presencia de un retraso mental previo que es muy variable. Para un diagnóstico fiable es importante conocer el punto de partida intelectual y adaptativo, del paciente, ya que pacientes con retraso mental moderado presentan menor riesgo de padecer demencia que los pacientes con retraso mental profundo o severo

(Oliver et al. 1998). Sin embargo, es el deterioro de la memoria reciente, al igual que sucede en la EA, el que suele marcar las fases iniciales del deterioro.

En la prueba de evitación pasiva, que se utiliza para medir específicamente memoria reciente, no se apreciaron diferencias importantes entre ambos genotipos, a pesar de que el animal TgDyrk1A adulto mostró cierta tendencia a descender de la plataforma antes. Sin embargo, los ratones TgDyrk1A viejos mostraron una peor retención tanto a corto (24 horas) como a medio (7 días) plazo comparados con los controles de la misma edad y durante la etapa adulta. Estos datos sugieren que la sobreexpresión de Dyrk1A podría estar afectando la memoria a corto y medio plazo favoreciendo el empeoramiento edad-dependiente de ésta, si bien no hemos podido determinar si las alteraciones son debidas a disfunciones durante la adquisición o la consolidación de la información. La pérdida de memoria reciente es la alteración cognitiva más precoz en la EA debido a que las vías colinérgicas procedentes del prosencéfalo basal que proyectan hacia corteza e hipocampo, circuitos neurales implicados en el aprendizaje y memoria reciente, son los que presentan un deterioro más temprano y más intenso en esta patología. En el SD se observa también esta degeneración colinérgica, siendo de nuevo una característica neuropatológica común a ambas patologías. El hecho de que el fenotipo degenerativo esté presente en el animal transgénico, plantea la posibilidad de que Dyrk1A pudiera estar participando en la instauración temprana de la EA en el SD.

1.4.2. Posible implicación del sistema colinérgico en los trastornos de memoria reciente asociados a la edad

En nuestro modelo se observó la típica reducción asociada a la edad del volumen de dos núcleos colinérgicos (MSN y VDB), siendo más llamativa en el núcleo MSN y que se acompañó de la consiguiente reducción en la celularidad total. Al estudiar la población colinérgica se pudo apreciar una reducción de neuronas Chat positivas con la edad que fue más marcada en TgDyrk1A y que en éste se correlacionó con la edad una tendencia a la reducción de neuronas marcadas frente al receptor de neurotrofinas p75 en ambos núcleos (Contestabile et al. 2006). Al no ser estos cambios muy relevantes se correlacionan mejor con la alteración leve observada en memoria reciente en nuestro modelo. De todos modos, estaría indicado utilizar otros sistemas como el ensayo radioenzimático para medir la actividad de la

acetilcolinesterasa por ser herramientas más sensibles en la determinación de la funcionalidad colinérgica, esperándose un incremento de ésta como reacción compensatoria a la pérdida colinérgica. La progresiva disfunción cerebral observada en la EA y el SD se ha relacionado con un inadecuado aporte trófico del sistema colinérgico por parte de las áreas diana. Este transporte retrógrado se realiza por unión de NGF al complejo formado por los receptores tróficos TrkA y p75 (Mufson et al. 1999). En el ratón TgDyrk1A viejo no se observó reducción de NGF a nivel del prosencéfalo basal como ocurre en la EA, el SD y el ratón trisómico Ts65Dn, sin embargo, existía una tendencia a mostrar mayor concentración de NGF en hipocampo y corteza cerebral, sugiriendo que el transporte retrogrado a través de las vías colinérgicas podría encontrarse levemente comprometido (Cooper et al. 2001). Por lo tanto, la degeneración colinérgica presente en el ratón TgDyrk1A mimetiza, aunque en un grado más leve a la descrita tanto en pacientes con SD como en el ratón Ts65Dn (Granholm et al. 2000, Seo y Isacson 2005). De hecho en el ratón Ts65Dn la degeneración colinérgica se observa desde los 6 meses, edad a la que nuestro modelo no presenta alteraciones colinérgicas. Estos datos sugieren que la sobreexpresión mantenida de Dyrk1A durante toda la vida podría estar favoreciendo, junto a la participación de otros genes como PPA la instauración temprana de la EA en el SD. De hecho, Dyrk1A se encuentra sobreexpresado en los cerebros de pacientes de EA desde estadios tempranos de la enfermedad (Ferrer et al. 2005) incidiendo en la posible participación de este gen en la relación entre ambas patologías. De todos modos, dada su función durante el neurodesarrollo, donde la expresión del gen es más abundante, *Dyrk1A* podría también estar modulando la integridad del sistema colinérgico a lo largo de toda la vida dando lugar a las alteraciones presentes en la etapa adulta y durante la vejez.

1.4.3. Memoria visuo-espacial

Los pacientes con SD presentan dificultades en tareas que requieren memoria espacial, una ejecución deficiente en memoria a largo plazo y dificultades para aprender tareas nuevas (Vicari 2006). De hecho, en los pacientes con SD, aunque se ha descrito alteración de la memoria verbal a corto plazo, en lo que se refiere a la memoria reciente de tipo contextual, no existen afectaciones relevantes a no ser que aparezca un cuadro de demencia tipo EA (Jarrold y Baddeley 2001). La exploración de las alteraciones en memoria visuo-espacial en diversos modelos

trisómicos ha permitido seleccionar como genes candidatos aquellos comprendidos en la región cromosómica entre Sod1 y Znf295 (revisado en Roubertoux et al. 2006). Dyrk1A está localizado en esta región y en varios modelos de sobreexpresión de Dyrk1A se han descrito diversas alteraciones en aprendizaje y memoria (Smith et al. 1997; Ahn et al. 2006). En nuestros experimentos, el ratón TgDyrk1A adulto, a pesar de que las diferencias no fueron relevantes, mostró un peor aprendizaje que sus respectivos controles, como ya había sido demostrado previamente (Altafaj et al. 2002). De hecho, en la prueba de retirada de la plataforma, que evalúa la memoria espacial, el animal transgénico permaneció significativamente menos tiempo en el cuadrante entrenado, un parámetro que indica la afectación de ésta. La alteración observada podría deberse a modificaciones en la circuitería hipocampo-cortical o en la propia integridad estructural del hipocampo, implicada directamente en esta prueba. Dado que Dyrk1A se ha involucrado en ciclo celular, cambios en celularidad en el hipocampo, similares a los descritos en pacientes con SD podrían estar implicados en este efecto. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios estereológicos ni electrofisiológicos que puedan confirmar esta hipótesis. Por otro lado, se ha descrito que Dyrk1A fosforila CREB (Yang et al. 2001), NFAT (Gwack et al. 2006) y otros factores de transcripción implicados en memoria y aprendizaje, por lo que otra posibilidad sería que la sobreexpresión estuviera modificando el grado de fosforilación de éstos, y consecuentemente, interfiriendo en estas funciones.

En relación al envejecimiento, una de las estructuras más afectadas es el hipocampo, observándose un declive importante en las tareas de aprendizaje dependientes de esta estructura. Este déficit no se relaciona tanto con la posible pérdida neuronal como con alteraciones en el número y morfología de las espinas dendríticas hipocámpicas (von Bohlen Und Halbach et al. 2006). Las alteraciones en la memoria visuo-espacial observadas en el SD con el envejecimiento no sufren un deterioro significativo a no ser que se instaure un cuadro de demencia (Nelson et al. 2005). En nuestro modelo, el estudio longitudinal mostró un empeoramiento asociado a la edad en el aprendizaje más acusado en el ratón TgDyrk1A, si bien los dos genotipos mostraron deterioro del aprendizaje con el protocolo empleado. Para determinar la implicación de la degeneración celular hipocámpica en este proceso será necesario realizar un estudio neuromorfológico de este sistema en nuestro

modelo en los dos cortes de edad empleados y determinar así, el impacto de la sobreexpresión de Dyrk1A sobre esta función. De todos modos, dado que en ambos genotipos se observó una disminución importante de la velocidad de natación, los resultados obtenidos pueden depender no sólo de alteraciones cognitivas asociadas al envejecimiento, sino también del deterioro motor.

Finalmente la flexibilidad cognitiva, función afectada en el SD, al igual que en varios modelos trisómicos como Ts65Dn y Ts1Cje, y en el ratón YAC157F, no no mostró déficit en el ratón TgDyrk1A en ninguna de las edades. De todos modos, la simplicidad de la metodología (una única sesión) utilizada en nuestro protocolo dificulta la posibilidad de detectar alteraciones a este nivel.

1.4.4. Impacto de la sobreexpresión de Dyrk1A sobre los mecanismos moleculares y celulares implicados en memoria y aprendizaje

En las personas con SD además del proceso neurodegenerativo específicamente relacionado con la edad, a partir del momento del nacimiento se produce un importante deterioro neuronal durante todo el periodo postnatal que conlleva una posible disminución de celularidad, una alteración de los procesos de diferenciación neuronal, que tienen como consecuencia la reducción de la complejidad dendrítica y una dismorfología espinal apareciendo una elevada proporción de espinas dendríticas inmaduras. Tanto el desarrollo postnatal anómalo como los procesos de remodelación de la circuitería cerebral contribuyen a las alteraciones dendríticas observadas en el SD, con consecuencias sobre las capacidades cognitivas. Este fenotipo se va agravando con el paso del tiempo, lo que determina que se produzca un declive progresivo de las facultades mentales sobre el retraso ya existente. Para poder determinar el impacto de estas alteraciones pre-existentes sobre los procesos neurodegenerativos asociados a la edad resulta, por tanto, imprescindible el estudio de los mecanismos celulares subyacentes.

De manera análoga a la morfología observada en el SD y en el ratón Ts65Dn (Dierssen et al. 2003), las neuronas piramidales corticales del ratón TgDyrk1A se caracterizan por una menor complejidad dendrítica y menor número de espinas (Manuscrito en preparación en colaboración con el Dr. J. de Felipe, Instituto Cajal,

Madrid). Asimismo, el modelo de haploinsuficiencia de Dyrk1A (Dyrk1A+/-) presenta alteraciones morfológicas similares, que se acompañan además de una reducción del área del soma (Benavides-Piccione et al. 2005), sugiriendo que la dosis correcta de DYRK1A es necesaria para el desarrollo de la arborización neuronal. De hecho, su participación en el proceso de neuritogenesis fue propuesta por Yang y colaboradores quienes observaron que el bloqueo de la activación de Dyrk1A atenúa el crecimiento neurítico en cultivos inmortalizados hipocámpicos (Yang et al. 2001).

La utilización de cultivos primarios supone una buena aproximación para el análisis de los cambios ocurridos durante la neuritogénesis y la sinaptogénesis a nivel cortical en nuestro modelo de sobreexpresión de Dyrk1A. En este modelo, el análisis neuromorfológico de cultivos primarios durante la neuritogénesis temprana (cultivos fijados a día 3 *in vitro*) no mostró diferencias en el área del soma ni en el número de ramificaciones principales comparando ambos genotipos. Además, no se observaron diferencias en el número de puntos de intersección sugiriendo que la complejidad de las ramificaciones era similar en ambos genotipos. Estos datos son consistentes con experimentos de caracterización morfológica del árbol dendrítico realizadas en colaboración con el Dr. J.deFelipe en estadios postnatales.

Sin embargo, el análisis morfométrico del axón indicó que en las neuronas transgénicas era más corto, especialmente en los segmentos terminales, es decir, aquellos que se extienden desde la última intersección. A falta de realizar un estudio morfológico en cultivos maduros para confirmar este acortamiento axonal, los resultados sugieren que DYRK1A podría jugar un papel relevante en la elongación del axón, bien interfiriendo en la velocidad de crecimiento o induciendo una inadecuada reorganización de los microtúbulos que provocaría un crecimiento anómalo. De hecho, estudios recientes indican que Dyrk1A participa en la vía de señalización Ras/MAPK, necesaria para el mantenimiento de la diferenciación neuronal y la orientación espacial del axón (Kelly y Rahmani 2005) e incluso sugieren que, junto con otras proteínas, podría estar constituyendo una nueva cascada MAPK implicada entre otros procesos en neurogénesis (Pellegrini-Calace y Tramontano 2006). Además, Dyrk1A tiene capacidad de fosforilar tau, una proteína citosólica que en condiciones no patológicas participa en la regulación de la

dinámica de los microtúbulos (Woods et al. 2001a). De todos modos, la morfogénesis de las neuronas depende en gran parte de la actividad de los conos de crecimiento presentes en los extremos terminales de dendritas y axones, ya que integran las señales de guía del cono axónico tanto intracelulares como extracelulares, coordinando la reorganización del citoesqueleto. En las neuronas transgénicas, a pesar del retraso en el crecimiento del axón, no hay variaciones en el tamaño del cono axónico, pero éstos aparecen en mayor cantidad respecto a las neuronas control, sin embargo en este estudio su actividad no ha podido ser constatada.

Por otro lado, el axón de las neuronas transgénicas presenta un mayor número y densidad de filopodios aunque más cortos que las neuronas no transgénicas. Los filopodios están formados por haces de filamentos de actina paralelos que, en las dendritas se relacionan con la constitución de las espinas, y en el axón contribuyen a la elongación o a la formación de ramificaciones. El hecho de que exista un mayor número de estructuras proliferantes (filopodios, conos de crecimiento...) en los cultivos transgénicos de Dyrk1A, debería sin embargo dar lugar una mayor complejidad una vez la neurona haya madurado. Por ello, uno de los procesos que habría que explorar es si los filopodios en crecimiento están estableciendo los contactos adecuados con otras estructuras (dendritas, axones de otras neuronas,..) que permitan la creación de una espina madura o la prolongación o bifurcación de las ramificaciones (Niell et al. 2004). En caso contrario, el filopodio sufriría una retracción y degeneración.

En cuanto a la morfología dendrítica, que aporta mayor información sobre el procesamiento de la información, en contraste con el axón, no se observan diferencias apreciables de longitud entre ambos genotipos. A pesar de que se observa una tendencia a una reducción en el tamaño de los segmentos intermedios que se puede relacionar con la frecuencia de ramificación, otros parámetros indican que no existen diferencias en la arborización dendrítica. Por otro lado, al igual que sucedía en el axón, las dendritas de neuronas que sobreexpresan Dyrk1A presentan una mayor densidad de filopodios de longitud menor. A falta de un estudio morfológico en cultivos maduros en los que el árbol dendrítico está plenamente constituido y las conexiones sinápticas entre dendritas están

establecidas, estos datos sugieren un árbol dendrítico empobrecido en espinas maduras coincidiendo con los datos obtenidos de neuronas piramidales en corteza adulta (datos no publicados). De hecho en los ratones transgénicos se observan menos contactos sinápticos maduros, lo que sugiere que posiblemente la sobreexpresión de Dyrk1A, de lugar a filopodios más inmaduros y menos capaces de establecer una sinapsis madura. En el modelo sinaptotrópico de desarrollo del árbol dendrítico, que defiende que el crecimiento de la dendrita se produce a partir de un contacto sináptico maduro, éstos explicarían los déficits de ramificación previamente comentados, y el fenotipo observado en el adulto.

Diversos estudios han postulado la participación de Dyrk1A durante la neuritogénesis y sinaptogénesis. Efectivamente, Dyrk1A interacciona con diversas proteínas sinápticas involucradas en el establecimiento de complejo sináptico, como dinamina que se transloca hasta la terminación sináptica durante la diferenciación neuronal para formar parte del anclaje sináptico o con la proteína de interacción con Huntingtina (Hip-1), con posible función en la endocitosis y el mantenimiento del citoesqueleto de actina (Kang et al. 2005). Por otro lado, debido a la capacidad de Dyrk1A para fosforilar diversos sustratos es posible que pueda estar modulando a su vez la reorganización del citoesqueleto afectando a la dinámica de la actina y a otras proteínas responsables del crecimiento filopodial como las GTPasas Rho u otras moléculas de señalización (ver *Introducción*).

Los resultados obtenidos sugieren que DYRK1A podría estar afectando a la neuritogénesis temprana regulando directa o indirectamente, la reorganización y dinámica del citoesqueleto (actina y microtúbulos), lo que conduciría a un retraso en el crecimiento y desarrollo de la ramificación neuronal afectando a la maduración del árbol neurítico con posibles implicaciones a nivel funcional.

Como se ha comentado en la *Introducción* y más arriba en esta discusión, la mayoría de los casos de retraso mental y disfunción cognitiva, incluido el SD, se han asociado con alteraciones en la morfología de las espinas dendríticas (Purpura 1974; Marin-Padilla 1976). Las espinas dendríticas constituyen las zonas postsinápticas de la mayoría de las sinapsis excitatorias de la corteza cerebral (ver *Introducción*). Las espinas no son estructuras estables y los cambios en su

morfología se han relacionado con el almacenamiento de la información a nivel celular, de forma que el incremento de la actividad sináptica puede favorecer la formación de nuevas espinas y dar lugar a cambios en la morfología de las espinas existentes (revisado en Tada y Sheng 2006, Carlisle y Kennedy 2005). Estos cambios morfológicos están regulados por la activación de receptores glutamatérgicos y vienen determinados por la polimerización y/o depolimerización del citoesqueleto de actina, en un equilibrio dinámico entre las formas filamentosas y monoméricas de actina (Halpain 2000). Estudios previos de FRAP indican que la mayoría de la actina presente en las espinas es dinámica (fracción móvil), existiendo una fracción estable en la que la incorporación de nuevos monómeros de actina es tan lenta que resulta inapreciable (Star et al. 2002). Las espinas dendríticas provenientes del ratón TgDyrk1A presentaron una fracción móvil menor que los controles, sugiriendo una menor tasa de recambio de monómeros entre la dendrita y la espina. Sin embargo, el tiempo medio de la recuperación era significativamente menor en las espinas del ratón TgDyrk1A indicando una difusión más rápida de los monómeros de actina hacia la espina. En estudios de FRAP realizados con citocalasina D, un inhibidor de la polimerización de actina, se ha observado una menor recuperación de la fluorescencia similar al observado en nuestro modelo. Por tanto se podría proponer que la sobreexpresión de Dyrk1A podría estar afectando a la polimerización de la actina aunque este dato no permite descartar su participación en otros procesos como la depolimerización, estabilización de los filamentos, nucleación de la actina o incluso la disgregación de los monómeros de actina desde las proteínas unidoras de actina, que también podrían modificar la ratio fracción estable/fracción móvil. Futuros experimentos de FRAP en nuestro modelo, empleando diferentes moduladores (citocalasina D, latruculina) de la dinámica de actina son necesarios para determinar los procesos concretos que pueden estar alterados. Por otra parte será necesario el estudio de otras proteínas implicadas en la regulación de la dinámica de la actina como Rho-GTPasa, Arp2/3, cortactina, profilina, gelsolina, debrina, etc, para poder esclarecer la participación de Dyrk1A en la dinámica de la espina.

Por otro lado, el efecto de la sobreexpresión de Dyrk1A sobre la dinámica de la actina podría depender de otros mecanismos. Así, la activación de los receptores NMDA y AMPA y su consecuente entrada de calcio, conlleva una disminución en el

recambio de actina y en la estabilización de los filamentos (Carlisle y Kennedy 2005; Ackermann y Matus 2003), reduciendo así la motilidad de las espinas. En el ratón TgDyrk1A se ha descrito una desregulación en las subunidades del receptor NMDA (comunicación personal de Jon Ortiz) que podría afectar a la entrada de calcio extracelular con consecuencias sobre la dinámica de la actina y por tanto, sobre los cambios morfológicos de las espinas. La influencia de las alteraciones de los receptores glutamatérgicos en nuestro modelo será estudiada mediante estudios de FRAP usando agonistas de NMDA. A pesar de que no se ha realizado un análisis morfológico comparativo de las espinas en nuestros cultivos, existen evidencias de que el ciclo dinámico de la actina es independiente del tamaño de la espina (Star et al. 2002), por lo que en principio los cambios observados en los experimentos de FRAP no dependerían de variaciones morfológicas.

En conjunto los resultados sugieren que la sobreexpresión de Dyrk1A podría afectar la motilidad de la espina ya que presenta características similares a las observadas cuando se inhibe la polimerización de actina. Ello podría afectar negativamente la plasticidad sináptica de ésta, con posibles consecuencias funcionales sobre los procesos cognitivos.

2. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE DYRK1A SOBRE LAS CONSECUENCIAS CONDUCTUALES Y COGNITIVAS DEL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL

La plasticidad cerebral es un proceso de gran importancia durante el periodo postnatal, que contribuye a la diferenciación neuronal y al establecimiento de la circuitería. En el contexto de los trastornos del neurodesarrollo se ha propuesto que el incremento de esta neuroplasticidad podría modular en cierta medida las alteraciones neuronales y de la conectividad cerebral. En este principio se basa la intervención temprana en los niños con SD, que mejora sus capacidades cognitivas, en algunos casos de forma importante. En lo que se refiere a los estudios en modelos experimentales de SD, hasta el momento tan sólo se han realizado experimentos de enriquecimiento ambiental postnatal en el ratón trisómico Ts65Dn (Martinez-Cue et al. 2002; Dierssen et al. 2003; Martinez-Cue et al. 2005)

obteniéndose la reversión de alguna de las deficiencias cognitivas y motoras aunque con una fuerte dependencia del sexo. En el contexto de esta Tesis, los experimentos en cultivos celulares primarios realizados en TgDyrk1A sugerían que la plasticidad sináptica pudiera estar comprometida en este modelo. En un intento de explorar este extremo *in vivo* y la posible aplicación como herramienta terapéutica para revertir alguno de los fenotipos alterados, se utilizó el paradigma experimental del enriquecimiento ambiental.

El efecto del enriquecimiento sobre la actividad y la emotividad es muy variable en ratones, en función de la cepa y del tipo de pruebas empleadas (ver *Introducción*). En nuestros experimentos la actividad exploratoria fue analizada mediante la tabla de agujeros que además de medir la tendencia exploratoria del ratón tiene en cuenta la actividad inespecífica, de forma que el número de exploraciones depende también de ésta. La actividad exploratoria específica suele aumentar tras la exposición a un ambiente enriquecido (van de Weerd et al. 1994), posiblemente por la familiarización con la presentación constante y prolongada de una diversidad de estímulos nuevos. Sin embargo, y de forma similar a lo que habíamos observado en experimentos anteriores utilizando el ratón Ts65Dn (Martinez-Cue et al. 2002), en nuestros experimentos con el modelo TgDyrk1A, los ratones macho no mostraron diferencias en actividad exploratoria ni en actividad inespecífica con respecto a los animales no enriquecidos en ambos genotipos. El enriquecimiento puede modificar sustancialmente la organización jerárquica de los ratones macho originando un cambio hacia una organización más territorial, lo que produce un incremento en el nivel de agresividad entre los componentes de la jaula (Haemisch y Gartner 1997). En nuestros experimentos la exposición a un ambiente enriquecido en los ratones macho incrementó el número de peleas, una conducta que podemos inferir se debía a un aumento del estrés, aunque éste no fue estudiado de forma específica. En el caso del modelo Ts65Dn, experimentos posteriores demostraron que los animales macho trisómicos presentan mayor subordinación que los controles, por lo que un ambiente enriquecido asociado a un incremento de los estímulos sociales y físicos aumenta su grado de estrés repercutiendo en la conducta y los procesos cognitivos (Martinez-Cue et al. 2005). En el ratón TgDyrk1A podría arguirse por tanto, que el exceso de estimulación social o física en los ratones macho podría afectar a la conducta a través de la alteración de componentes emocionales. En efecto, la

exposición a la tabla de agujeros, que no deja de ser un espacio abierto, produjo una conducta ansiosa de los ratones macho enriquecidos, reflejada en un incremento de la conducta de congelamiento, si bien es necesario definir con más precisión este extremo.

En el caso de las hembras no se establecen relaciones jerárquicas tan consolidadas permitiendo así detectar efectos de la estabulación en condiciones de enriquecimiento ambiental, sin que el factor de estrés afecte de forma tan importante al experimento. En nuestro estudio, en condiciones de estabulación estándar, las ratonas TgDyrk1A se mostraron más activas que sus respectivas controles, como se constató por el mayor número de exploraciones. Este incremento de actividad había sido descrito en nuestros experimentos previos, si bien únicamente se había explorado en machos en otros entornos experimentales. Sin embargo, la hiperactividad observada es cualitativamente diferente en hembras, ya que los machos no la presentan en la tabla de agujeros. Ello sugiere que la sobreexpresión de Dyrk1A podría estar afectando de forma diferencial a ambos sexos, al igual que se ha observado en los ratones trisómicos, y hace necesario explorar el fenotipo de forma más detallada en hembras, determinando el grado de hiperactividad en otros entornos experimentales y la dependencia de factores como la impulsividad o el grado de emotividad en la misma. Tras el enriquecimiento ambiental, las ratonas control incrementaron notablemente el número de exploraciones, llegando a alcanzar valores más altos que las transgénicas enriquecidas. Este aumento no es inespecífico ya que la tendencia exploratoria aumentó, como reflejan el incremento del tiempo total de exploración y la duración media de las exploraciones. Sin embargo, el enriquecimiento no modificó la conducta de las ratonas TgDyrk1A, sugiriendo que la sobreexpresión de Dyrk1A reduce la capacidad de interacción con las modificaciones ambientales proporcionadas.

Durante años se ha demostrado que el enriquecimiento ambiental produce efectos positivos en aprendizaje y memoria, especialmente en tareas de memoria visuoespacial dependiente de hipocampo (Falkenberg et al. 1992; Paylor et al. 1992; Tees et al. 1990; Kempermann et al. 1998; Leggio et al. 2005) que se han correlacionado con un incremento de la neurogénesis en esta estructura (Brue-

Jungerman et al. 2005). Al igual que sucedía en las pruebas de actividad exploratoria en los ratones machos no se observó una mejora del aprendizaje con el enriquecimiento en el paradigma del laberinto acuático de Morris, si bien, en los ratones transgénicos enriquecidos este tratamiento produjo un efecto claramente más negativo como demostró el menor porcentaje de reducción de latencia de llegada a la plataforma entre la primera y la última sesión. De nuevo estos resultados son muy similares a los obtenidos con ratones trisómicos. En nuestro caso, sin embargo, y de forma opuesta a las observaciones realizadas en los ratones trisómicos, se observa una disminución en la velocidad de natación de los animales enriquecidos, especialmente en los controles, que no se manifiesta durante la sesión de entrenamiento pero es patente en la sesión de aprendizaje guiado, lo que sugiere que no existen problemas motores específicos, ya los animales enriquecidos realizaron latencias mucho más bajas con respecto a la última sesión de adquisición. Debido a las diferencias existentes en velocidad, para valorar la ejecución global de la prueba, se analizó la evolución de las distancias recorridas en la fase de adquisición. Si bien todos los grupos de animales disminuyeron la distancia recorrida a lo largo de las sesiones, es decir, aprendieron a localizar la plataforma, nuevamente los animales TgDyrk1A enriquecidos mostraron una menor reducción entre la primera y la última sesión. Por otro lado, los ratones macho enriquecidos ejecutaron peor la prueba de retirada de la plataforma que evalúa la memoria visuo-espacial, principalmente dependiente de hipocampo. Por último, la flexibilidad cognitiva, función regulada por la corteza prefrontal, tampoco se vio modificada favorablemente por el enriquecimiento ambiental. Dado que la exposición a estrés deteriora el aprendizaje en el laberinto acuático de Morris (Zaharia et al. 1996), en nuestro caso las condiciones de estabulación enriquecidas, que como se discute más arriba podrían ser estresantes, determinarían la falta de efectos beneficiosos en aprendizaje y memoria visuo-espacial.

En el caso de las hembras, y aunque estos datos son claramente preliminares debido al escaso número de animales empleados hasta el momento, se observa un patrón conductual muy diferente al de los ratones macho. Hasta el momento, no se habían explorado en el TgDyrk1A las diferencias de ejecución de tareas de aprendizaje diferenciando ratones hembra y macho. En relación con estas diferencias relativas al sexo, en nuestros experimentos se observó una mejor

adquisición en los ratones machos en el laberinto acuático, como demostraron las menores latencias de llegada a la plataforma en los machos no enriquecidos comparados con las hembras no enriquecidas de ambos genotipos. Estas diferencias son similares a las que se detectaron en ratones trisómicos sin que se puedan adscribir al genotipo, sino que son observadas en todos los grupos. Se sabe que muchos procesos cognitivos tienen lugar de manera diferente en machos y hembras, realizando los machos menos errores que las hembras en tareas relacionadas con memoria de referencia. De hecho, los machos atienden más a los aspectos geométricos de la habitación mientras que las hembras utilizan elementos de contexto del ambiente como elementos de guía para establecer localizaciones espaciales específicas (Williams et al. 1990). Es posible que tales diferencias sean responsables de los cambios sexo-dependientes que observamos.

Al analizar el efecto de la exposición al enriquecimiento ambiental en las hembras, se apreció una ligera mejoría en la adquisición de la tarea en las hembras control con respecto a las no enriquecidas del mismo genotipo, mientras que en las ratonas transgénicas no se observaron diferencias comportamentales. A pesar de lo preliminar de los resultados, éstos apuntan a que las condiciones de estabulación enriquecidas podrían modificar aprendizaje y memoria visuo-espacial, y que la sobreexpresión de *Dyrk1A* interfiere en la modulación del fenotipo conductual derivada del cambio ambiental. A pesar de que los efectos positivos del enriquecimiento sobre el aprendizaje pueden ser probablemente debidos a modificaciones funcionales en el hipocampo, es posible hallar cambios morfológicos en la neocorteza ya que en el proceso de consolidación de la memoria intervienen ambas estructuras a través de las conexiones hipocampo-corticales (Rampon et al. 2000). En efecto, los resultados conductuales obtenidos en el ratón *Ts65Dn* se han correlacionado con un incremento en la complejidad del árbol dendrítico de las neuronas piramidales corticales en los animales control enriquecidos, mientras que en los ratones trisómicos no se observaron cambios morfológicos relevantes (Dierssen et al. 2003). Primeros datos neuromorfológicos obtenidos mediante experimentos similares en nuestro modelo de sobreexpresión de *Dyrk1A* (comunicación personal Dr J. De Felipe) no muestran cambios estructurales en las neuronas piramidales del *TgDyrk1A* enriquecido, pero sí un incremento en la ramificación y longitud dendrítica en los controles tras el enriquecimiento ambiental.

El conjunto de estos resultados determinan que la plasticidad sináptica en nuestro modelo esta fuertemente comprometida y que posiblemente Dyrk1A esté contribuyendo al fenotipo alterado observado en el ratón Ts65Dn.

Finalmente, para evaluar los efectos del enriquecimiento sobre la memoria a corto y medio plazo se utilizó la prueba de evitación pasiva. Esta prueba únicamente fue posible realizarla en ratones macho, por lo que no se discuten los resultados en hembras. La prueba evitación pasiva requiere una gran integración psicomotora ya que el animal debe recordar el estímulo aversivo e inhibir entonces su tendencia natural a bajarse de la plataforma. El análisis de la memoria a corto (a las 24 horas) y a medio plazo (a los 7 días) no reveló diferencias entre genotipos. Estas diferencias sin embargo, aparecen en edades más tardías como se ha discutido previamente, observándose a los seis meses una peor ejecución en los ratones transgénicos. Tras el enriquecimiento se observa una cierta mejoría de la respuesta en los ratones control enriquecidos respecto a los no enriquecidos, en memoria a corto plazo, sugiriendo un posible efecto beneficioso del enriquecimiento a este nivel. Por el contrario, en los ratones transgénicos enriquecidos la latencia de descenso de la plataforma era significativamente menor que en el resto de los grupos, sugiriendo de nuevo un efecto diferencial del enriquecimiento en los ratones de este genotipo. Este efecto negativo se observó también en la memoria a medio plazo (a los 7 días), que estaba más alterada en los animales transgénicos enriquecidos que en el resto de los grupos. Estos resultados podrían ser interpretados bien como una alteración específica de la capacidad de retención a corto y medio plazo, o bien como una pobre inhibición de la conducta que sería esperable teniendo en cuenta la situación de estrés que el enriquecimiento parece promover en nuestro modelo experimental. Si atribuimos los cambios observados a alteraciones en memoria reciente, podríamos proponer que el enriquecimiento podría haber provocado una disregulación a nivel colinérgico en el ratón TgDyrk1A, si bien este aspecto precisa de futuros estudios histológicos para poder ser corroborado.

A pesar de los resultados negativos observados en la conducta, los experimentos realizados en el micro-PET, mostraron un incremento de la actividad cerebral en los animales enriquecidos machos, independientemente del genotipo. Estos resultados

sugieren que a nivel neuroestructural posiblemente se hayan producido cambios sutiles que no hayan tenido consecuencias detectables a nivel conductual. El estudio neuromorfológico de los cerebros enriquecidos aportará nuevos datos sobre la capacidad de adaptación neuronal durante el periodo postnatal, indicando el grado de compromiso de la plasticidad sináptica en el modelo de sobreexpresión de *Dyrk1A* y la contribución de este gen al fenotipo observado en el modelo Ts65Dn. En conjunto nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de *Dyrk1A* está provocando alteraciones como consecuencia del desequilibrio génico que interfieren con la eficacia del enriquecimiento ambiental. Dada la influencia de este tratamiento ambiental sobre aspectos estructurales y conductuales asociados a la plasticidad sináptica, y la posible implicación de *Dyrk1A* en las vías de señalización subyacentes a ésta, proponemos que muy posiblemente la disregulación de este gen altera los procesos moduladores sinápticos con consecuencias limitantes sobre la neuroplasticidad.

CONCLUSIONES



1. Nuestros resultados demuestran que Dyrk1A juega un papel en el control de la función motora fundamentalmente en lo referente a la actividad, coordinación motora y organización de patrones motores. Las alteraciones motoras producidas por el desequilibrio de dosis de este gen se relacionan con una disfunción del sistema dopaminérgico nigroestriatal que es diferencial en los modelos de pérdida o de ganancia de función.
2. La disregulación de los niveles de expresión de Dyrk1A modifica el patrón de deterioro neurológico asociado al envejecimiento, sugiriendo su implicación en procesos neurodegenerativos. Las alteraciones cognitivas y conductuales asociadas a la edad que aparecen en el modelo transgénico, sugieren que este gen podría participar en el proceso neurodegenerativo propio del SD.
3. La afectación de la memoria reciente que se observa en el modelo de sobreexpresión de Dyrk1A a edades avanzadas, posiblemente está relacionada con la alteración detectada a nivel del sistema colinérgico. La similitud de este fenotipo con el del modelo Ts65Dn, sugiere una participación relevante de Dyrk1A, junto con otros genes del cromosoma 21, en la relación entre EA y SD.
4. En la corteza cerebral la sobreexpresión de Dyrk1A provoca alteraciones en neuritogénesis caracterizadas por un retraso en la elongación del axón y una alteración en el número y tamaño de estructuras proliferantes, sugiriendo la patogenicidad de la sobreexpresión de este gen en las alteraciones del aparato dendrítico presentes en SD.
5. Los estudios de FRAP sugieren que estas alteraciones podrían deberse a una disfunción de los procesos de regulación dinámica del citoesqueleto de actina.
6. El enriquecimiento ambiental en el modelo transgénico de sobreexpresión de Dyrk1A no produjo efectos beneficiosos a nivel conductual en ratones macho, posiblemente debido a un aumento del estrés. A pesar de esta falta de efecto a nivel conductual, el enriquecimiento produjo cambios en la actividad

cerebral como revelaron los experimentos de imagen *in vivo* (micro-PET). En hembras, el tratamiento ambiental fue eficaz en el control pero no en las ratonas transgénicas, sugiriendo una alteración de la neuroplasticidad en nuestro modelo. Este patrón de respuesta es similar al descrito en el ratón Ts65Dn.

En conclusión, nuestros resultados implican a Dyrk1A en el deterioro asociado a la edad de la función motora y la memoria reciente, posiblemente a través de la alteración en los sistemas de neurotransmisión dopaminérgico y colinérgico, respectivamente. Además, sugieren que la sobreexpresión de Dyrk1A tiene consecuencias patogenéticas en los procesos de neuritogénesis, probablemente a través de la modulación de la dinámica del citoesqueleto de actina. Estas alteraciones podrían ser responsables de la falta de efectos cognitivo-conductuales observada en ratones transgénicos en el modelo de neuroplasticidad *in vivo* (enriquecimiento ambiental).

BIBLIOGRAFÍA



- Ackermann M. and Matus A. (2003) Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nat Neurosci* **6**, 1194-1200.
- 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. and Song W. J. (2006) DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiol Dis*.
- Alexander G. E., Saunders A. M., Szczepanik J., Strassburger T. L., Pietrini P., Dani A., Furey M. L., Mentis M. J., Roses A. D., Rapoport S. I. and Schapiro M. B. (1997) Relation of age and apolipoprotein E to cognitive function in Down syndrome adults. *Neuroreport* **8**, 1835-1840.
- Altafaj X., Dierssen M., Baamonde C., Marti E., Visa J., Guimera J., Oset M., Gonzalez J. R., Florez J., Fillat C. and Estivill X. (2001) Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum Mol Genet* **10**, 1915-1923.
- Alvarez M., Estivill X. and 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.
- Allen S. J., MacGowan S. H., Treanor J. J., Feeney R., Wilcock G. K. and Dawbarn D. (1991) Normal beta-NGF content in Alzheimer's disease cerebral cortex and hippocampus. *Neurosci Lett* **131**, 135-139.
- Anneren G. and Pueschel S. M. (1996) *Preventive medical care*, Cassell, London.
- Antonarakis S. E., Petersen M. B., McInnis M. G., Adelsberger P. A., Schinzel A. A., Binkert F., Pangalos C., Raoul O., Slaugenhaupt S. A., Hafez M. and et al. (1992) The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* **50**, 544-550.
- Arendash G. W., Garcia M. F., Costa D. A., Cracchiolo J. R., Wefes I. M. and Potter H. (2004) Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable beta-amyloid deposition. *Neuroreport* **15**, 1751-1754.
- Armstrong R. A. (1994) Differences in beta-amyloid (beta/A4) deposition in human patients with Down's syndrome and sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **169**, 133-136.
- 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., Yamasaki N., Miyakawa T., Francke U., Graef I. A. and Crabtree G. R. (2006) NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature*.
- Aylward E. H., Burt D. B., Thorpe L. U., Lai F. and Dalton A. (1997a) Diagnosis of dementia in individuals with intellectual disability. *J Intellect Disabil Res* **41 (Pt 2)**, 152-164.
- Aylward E. H., Habbak R., Warren A. C., Pulsifer M. B., Barta P. E., Jerram M. and Pearlson G. D. (1997b) Cerebellar volume in adults with Down syndrome. *Arch Neurol* **54**, 209-212.
- Ball S. L., Holland A. J., Huppert F. A., Treppner P., Watson P. and Hon J. (2004) The modified CAMDEX informant interview is a valid and reliable tool for use in the diagnosis of dementia in adults with Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res* **48**, 611-620.
- Barbiero L., Benussi L., Ghidoni R., Alberici A., Russo C., Schettini G., Pagano S. F., Parati E. A., Mazzoli F., Nicosia F., Signorini S., Feudatari E. and Binetti G. (2003) BACE-2 is overexpressed in Down's syndrome. *Exp Neurol* **182**, 335-345.

- Barlow C., Hirotsune S., Paylor R., Liyanage M., Eckhaus M., Collins F., Shiloh Y., Crawley J. N., Ried T., Tagle D. and Wynshaw-Boris A. (1996) Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* **86**, 159-171.
- Baxter L. L., Moran T. H., Richtsmeier J. T., Troncoso J. and Reeves R. H. (2000) Discovery and genetic localization of Down syndrome cerebellar phenotypes using the Ts65Dn mouse. *Hum Mol Genet* **9**, 195-202.
- Becker L., Mito T., Takashima S. and Onodera K. (1991) Growth and development of the brain in Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* **373**, 133-152.
- Becker L. E., Armstrong D. L. and Chan F. (1986) Dendritic atrophy in children with Down's syndrome. *Ann Neurol* **20**, 520-526.
- Becker L. E., Mito T., Takashima S., Onodera K. and Friend W. C. (1993) Association of phenotypic abnormalities of Down syndrome with an imbalance of genes on chromosome 21. *APMIS Suppl* **40**, 57-70.
- Becker W. and 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., Weber Y., Wetzel K., Eirmbter K., Tejedor F. J. and Joost H. G. (1998) Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J Biol Chem* **273**, 25893-25902.
- Belichenko P. V., Masliah E., Kleschevnikov A. M., Villar A. J., Epstein C. J., Salehi A. and Mobley W. C. (2004) Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of Down Syndrome. *J Comp Neurol* **480**, 281-298.
- Benaroya-Milshtein N., Hollander N., Apter A., Kukulansky T., Raz N., Wilf A., Yaniv I. and Pick C. G. (2004) Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci* **20**, 1341-1347.
- Benavides-Piccione R., Ballesteros-Yanez I., de Lagran M. M., Elston G., Estivill X., Fillat C., Defelipe J. and Dierssen M. (2004) On dendrites in Down syndrome and DS murine models: a spiny way to learn. *Prog Neurobiol* **74**, 111-126.
- Benavides-Piccione R., Dierssen M., Ballesteros-Yanez I., Martinez de Lagran M., Arbones M. L., Fotaki V., DeFelipe J. and Elston G. N. (2005) Alterations in the phenotype of neocortical pyramidal cells in the Dyrk1A^{+/-} mouse. *Neurobiol Dis* **20**, 115-122.
- Bennett J. C., McRae P. A., Levy L. J. and Frick K. M. (2006) Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. *Neurobiol Learn Mem* **85**, 139-152.
- Bescond M. and Rahmani Z. (2005) Dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1A (DYRK1A) interacts with the phytanoyl-CoA alpha-hydroxylase associated protein 1 (PAHX-AP1), a brain specific protein. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 775-783.
- Bessa J. M., Oliveira M., Cerqueira J. J., Almeida O. F. and Sousa N. (2005) Age-related qualitative shift in emotional behaviour: paradoxical findings after re-exposure of rats in the elevated-plus maze. *Behav Brain Res* **162**, 135-142.
- Bierer L. M., Haroutunian V., Gabriel S., Knott P. J., Carlin L. S., Purohit D. P., Perl D. P., Schmeidler J., Kanof P. and Davis K. L. (1995) Neurochemical correlates of dementia severity

in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J Neurochem* **64**, 749-760.

Blusztajn J. K. and Berse B. (2000) The cholinergic neuronal phenotype in Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis* **15**, 45-64.

Boehm G. W., Sherman G. F., Hoplight B. J., 2nd, Hyde L. A., Waters N. S., Bradway D. M., Galaburda A. M. and Denenberg V. H. (1996) Learning and memory in the autoimmune BXSB mouse: effects of neocortical ectopias and environmental enrichment. *Brain Res* **726**, 11-22.

Boguszewski P. and Zagrodzka J. (2002) Emotional changes related to age in rats--a behavioral analysis. *Behav Brain Res* **133**, 323-332.

Bothe G. W., Bolivar V. J., Vedder M. J. and Geistfeld J. G. (2005) Behavioral differences among fourteen inbred mouse strains commonly used as disease models. *Comp Med* **55**, 326-334.

Branchi I., Bichler Z., Minghetti L., Delabar J. M., Malchiodi-Albedi F., Gonzalez M. C., Chettouh Z., Nicolini A., Chabert C., Smith D. J., Rubin E. M., Migliore-Samour D. and Alleva E. (2004) Transgenic mouse in vivo library of human Down syndrome critical region 1: association between DYRK1A overexpression, brain development abnormalities, and cell cycle protein alteration. *J Neuropathol Exp Neurol* **63**, 429-440.

Bredy T. W., Zhang T. Y., Grant R. J., Diorio J. and Meaney M. J. (2004) Peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal development and glutamate receptor subunit expression. *Eur J Neurosci* **20**, 1355-1362.

Brezun J. M. and Daszuta A. (1999) Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* **89**, 999-1002.

Bruel-Jungerman E., Laroche S. and Rampon C. (2005) New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* **21**, 513-521.

Burt D. B., Loveland K. A., Chen Y. W., Chuang A., Lewis K. R. and Cherry L. (1995) Aging in adults with Down syndrome: report from a longitudinal study. *Am J Ment Retard* **100**, 262-270.

Burt D. B., Primeaux-Hart S., Loveland K. A., Cleveland L. A., Lewis K. R., Lesser J. and Pearson P. L. (2005) Aging in adults with intellectual disabilities. *Am J Ment Retard* **110**, 268-284.

Busciglio J. and Yankner B. A. (1995) Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature* **378**, 776-779.

Busciglio J., Pelsman A., Wong C., Pigino G., Yuan M., Mori H. and Yankner B. A. (2002) Altered metabolism of the amyloid beta precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome. *Neuron* **33**, 677-688.

Cancedda L., Putignano E., Sale A., Viegi A., Berardi N. and Maffei L. (2004) Acceleration of visual system development by environmental enrichment. *J Neurosci* **24**, 4840-4848.

Canet-Aviles R. M., Anderton M., Hooper N. M., Turner A. J. and Vaughan P. F. (2002) Muscarine enhances soluble amyloid precursor protein secretion in human neuroblastoma SH-SY5Y by a pathway dependent on protein kinase C(alpha), src-tyrosine kinase and

extracellular signal-regulated kinase but not phospholipase C. *Brain Res Mol Brain Res* **102**, 62-72.

Canevari L., Abramov A. Y. and Duchen M. R. (2004) Toxicity of amyloid beta peptide: tales of calcium, mitochondria, and oxidative stress. *Neurochem Res* **29**, 637-650.

Capsoni S., Ugolini G., Comparini A., Ruberti F., Berardi N. and Cattaneo A. (2000) Alzheimer-like neurodegeneration in aged antinerve growth factor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6826-6831.

Carlisle H. J. and Kennedy M. B. (2005) Spine architecture and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* **28**, 182-187.

Carr J. (1970) Mental and motor development in young mongol children. *J Ment Defic Res* **14**, 205-220.

Chen-Hwang M. C., Chen H. R., Elzinga M. and Hwang Y. W. (2002) Dynamin is a minibrain kinase/dual specificity Yak1-related kinase 1A substrate. *J Biol Chem* **277**, 17597-17604.

Clark H. B., Burrig E. N., Yunis W. S., Larson S., Wilcox C., Hartman B., Matilla A., Zoghbi H. Y. and Orr H. T. (1997) Purkinje cell expression of a mutant allele of SCA1 in transgenic mice leads to disparate effects on motor behaviors, followed by a progressive cerebellar dysfunction and histological alterations. *J Neurosci* **17**, 7385-7395.

Coleman M. (1978) Down's syndrome. *Pediatr Ann* **7**, 90-103.

Collacott R. A. (1992) The effect of age and residential placement on adaptive behaviour of adults with Down's syndrome. *Br J Psychiatry* **161**, 675-679.

Connolly B. H., Morgan S. B., Russell F. F. and Fulliton W. L. (1993) A longitudinal study of children with Down syndrome who experienced early intervention programming. *Phys Ther* **73**, 170-179; discussion 179-181.

Contestabile A., Fila T., Bartesaghi R. and Ciani E. (2006) Choline acetyltransferase activity at different ages in brain of Ts65Dn mice, an animal model for Down's syndrome and related neurodegenerative diseases. *J Neurochem* **97**, 515-526.

Cooper J. D., Salehi A., Delcroix J. D., Howe C. L., Belichenko P. V., Chua-Couzens J., Kilbridge J. F., Carlson E. J., Epstein C. J. and Mobley W. C. (2001) Failed retrograde transport of NGF in a mouse model of Down's syndrome: reversal of cholinergic neurodegenerative phenotypes following NGF infusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10439-10444.

Cooper S. A. and Prasher V. P. (1998) Maladaptive behaviours and symptoms of dementia in adults with Down's syndrome compared with adults with intellectual disability of other aetiologies. *J Intellect Disabil Res* **42 (Pt 4)**, 293-300.

Corder E. H., Saunders A. M., Strittmatter W. J., Schmechel D. E., Gaskell P. C., Small G. W., Roses A. D., Haines J. L. and Pericak-Vance M. A. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921-923.

Corder E. H., Saunders A. M., Risch N. J., Strittmatter W. J., Schmechel D. E., Gaskell P. C., Jr., Rimmler J. B., Locke P. A., Conneally P. M., Schmader K. E. and et al. (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* **7**, 180-184.

- Costa A. C. and Grybko M. J. (2005) Deficits in hippocampal CA1 LTP induced by TBS but not HFS in the Ts65Dn mouse: a model of Down syndrome. *Neurosci Lett* **382**, 317-322.
- Costa A. C., Walsh K. and Davisson M. T. (1999) Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome. *Physiol Behav* **68**, 211-220.
- Costa R. M., Cohen D. and Nicoletis M. A. (2004) Differential corticostriatal plasticity during fast and slow motor skill learning in mice. *Curr Biol* **14**, 1124-1134.
- Counts S. E., Nadeem M., Wu J., Ginsberg S. D., Saragovi H. U. and Mufson E. J. (2004) Reduction of cortical TrkA but not p75(NTR) protein in early-stage Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **56**, 520-531.
- Coussons-Read M. E. and Crnic L. S. (1996) Behavioral assessment of the Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome: altered behavior in the elevated plus maze and open field. *Behav Genet* **26**, 7-13.
- Coyle J. T., Oster-Granite M. L. and Gearhart J. D. (1986) The neurobiologic consequences of Down syndrome. *Brain Res Bull* **16**, 773-787.
- Cuskelly M., Jobling A. and Buckley S. (2002) *Down syndrome across the life span*, London.
- Chamove A. S. (1989) Cage design reduces emotionality in mice. *Lab Anim* **23**, 215-219.
- Chaouloff F. (1989) Physical exercise and brain monoamines: a review. *Acta Physiol Scand* **137**, 1-13.
- Chapillon P., Manneche C., Belzung C. and Caston J. (1999) Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. *Behav Genet* **29**, 41-46.
- Chen-Hwang M. C., Chen H. R., Elzinga M. and Hwang Y. W. (2002) Dynamin is a minibrain kinase/dual specificity Yak1-related kinase 1A substrate. *J Biol Chem* **277**, 17597-17604.
- Darwish M., Koranyi L., Nyakas C. and Almeida O. F. (2001) Exposure to a novel stimulus reduces anxiety level in adult and aging rats. *Physiol Behav* **72**, 403-407.
- Davis K. L., Mohs R. C., Marin D., Purohit D. P., Perl D. P., Lantz M., Austin G. and Haroutunian V. (1999) Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease. *Jama* **281**, 1401-1406.
- Davis W. E. and Kelso J. A. (1982) Analysis of "invariant characteristics" in the motor control of down's syndrome and normal subjects. *J Mot Behav* **14**, 194-212.
- Davisson M. T., Schmidt C. and 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. and Bronson R. T. (1993) Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* **384**, 117-133.
- de Graaf K., Hekerman P., Spelten O., Herrmann A., Packman L. C., Bussow K., Muller-Newen G. and Becker W. (2004) Characterization of cyclin L2, a novel cyclin with an arginine/serine-rich domain: phosphorylation by DYRK1A and colocalization with splicing factors. *J Biol Chem* **279**, 4612-4624.

- de Graaf K., Czajkowska H., Rottmann S., Packman L. C., Lilischkis R., Luscher B. and Becker W. (2006) The protein kinase DYRK1A phosphorylates the splicing factor SF3b1/SAP155 at Thr434, a novel in vivo phosphorylation site. *BMC Biochem* **7**, 7.
- DeFelipe J. and Farinas I. (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* **39**, 563-607.
- Delabar J. M., Theophile D., Rahmani Z., Chettouh Z., Blouin J. L., Prieur M., Noel B. and Sinet P. M. (1993) Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet* **1**, 114-124.
- Delbono O. (2003) Neural control of aging skeletal muscle. *Aging Cell* **2**, 21-29.
- Demas G. E., Nelson R. J., Krueger B. K. and Yarowsky P. J. (1996) Spatial memory deficits in segmental trisomic Ts65Dn mice. *Behav Brain Res* **82**, 85-92.
- Devenny D. A., Silverman W. P., Hill A. L., Jenkins E., Sersen E. A. and Wisniewski K. E. (1996) Normal ageing in adults with Down's syndrome: a longitudinal study. *J Intellect Disabil Res* **40 (Pt 3)**, 208-221.
- Dierssen M., Vallina I. F., Baamonde C., Garcia-Calatayud S., Lumbreras M. A. and Florez J. (1997) Alterations of central noradrenergic transmission in Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Brain Res* **749**, 238-244.
- Dierssen M., Fillat C., Crnic L., Arbones M., Florez J. and Estivill X. (2001) Murine models for Down syndrome. *Physiol Behav* **73**, 859-871.
- Dierssen M., Benavides-Piccione R., Martinez-Cue C., Estivill X., Florez J., Elston G. N. and DeFelipe J. (2003) Alterations of neocortical pyramidal cell phenotype in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: effects of environmental enrichment. *Cereb Cortex* **13**, 758-764.
- Dotti C. G., Sullivan C. A. and Banker G. A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* **8**, 1454-1468.
- Down J. L. H. (1866) Observations of ethnic classification of idiots. *Lond Hosp Rep* **3**, 259-262.
- Elston G. N. and DeFelipe J. (2002) Spine distribution in cortical pyramidal cells: a common organizational principle across species. *Prog Brain Res* **136**, 109-133.
- Epstein C. J. (2002) 2001 William Allan Award Address. From Down syndrome to the "human" in "human genetics". *Am J Hum Genet* **70**, 300-313.
- Erickson C. A. and Barnes C. A. (2003) The neurobiology of memory changes in normal aging. *Exp Gerontol* **38**, 61-69.
- Escorihuela R. M., Tobena A. and Fernandez-Teruel A. (1994) Environmental enrichment reverses the detrimental action of early inconsistent stimulation and increases the beneficial effects of postnatal handling on shuttlebox learning in adult rats. *Behav Brain Res* **61**, 169-173.
- Escorihuela R. M., Fernandez-Teruel A., Vallina I. F., Baamonde C., Lumbreras M. A., Dierssen M., Tobena A. and Florez J. (1995) A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neurosci Lett* **199**, 143-146.
- Evans D. A., Hebert L. E., Beckett L. A., Scherr P. A., Albert M. S., Chown M. J., Pilgrim D. M. and Taylor J. O. (1997) Education and other measures of socioeconomic status and risk of

incident Alzheimer disease in a defined population of older persons. *Arch Neurol* **54**, 1399-1405.

Faherty C. J., Raviie Shepherd K., Herasimtschuk A. and Smeyne R. J. (2005) Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental Parkinsonism. *Brain Res Mol Brain Res* **134**, 170-179.

Falkenberg T., Mohammed A. K., Henriksson B., Persson H., Winblad B. and Lindfors N. (1992) Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci Lett* **138**, 153-156.

Fernagut P. O., Chalon S., Diguët E., Guilloteau D., Tison F. and Jaber M. (2003) Motor behaviour deficits and their histopathological and functional correlates in the nigrostriatal system of dopamine transporter knockout mice. *Neuroscience* **116**, 1123-1130.

Fernagut P. O., Diguët E., Stefanova N., Biran M., Wenning G. K., Canioni P., Bioulac B. and Tison F. (2002) Subacute systemic 3-nitropropionic acid intoxication induces a distinct motor disorder in adult C57Bl/6 mice: behavioural and histopathological characterisation. *Neuroscience* **114**, 1005-1017.

Fernandez C. I., Collazo J., Bauza Y., Castellanos M. R. and Lopez O. (2004) Environmental enrichment-behavior-oxidative stress interactions in the aged rat: issues for a therapeutic approach in human aging. *Ann N Y Acad Sci* **1019**, 53-57.

Fernandez-Teruel A., Escorihuela R. M., Castellano B., Gonzalez B. and Tobena A. (1997) Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behav Genet* **27**, 513-526.

Fernandez-Teruel A., Escorihuela R. M., Nunez J. F., Goma M., Driscoll P. and Tobena A. (1992) Early stimulation effects on novelty-induced behavior in two psychogenetically-selected rat lines with divergent emotionality profiles. *Neurosci Lett* **137**, 185-188.

Ferrer I. and Gullotta F. (1990) Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta Neuropathol (Berl)* **79**, 680-685.

Ferrer I., Barrachina M., Puig B., Martinez de Lagran M., Marti E., Avila J. and Dierssen M. (2005) Constitutive Dyrk1A is abnormally expressed in Alzheimer disease, Down syndrome, Pick disease, and related transgenic models. *Neurobiol Dis* **20**, 392-400.

Florez J. (1992) *Neurologic abnormalities*, pp 159-173. Brookes Pub. Co, Baltimore.

Fodero L. R., Mok S. S., Losic D., Martin L. L., Aguilar M. I., Barrow C. J., Livett B. G. and Small D. H. (2004) Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors mediate an Aβ(1-42)-induced increase in the level of acetylcholinesterase in primary cortical neurones. *J Neurochem* **88**, 1186-1193.

Fotaki V., Dierssen M., Alcantara S., Martinez S., Marti E., Casas C., Visa J., Soriano E., Estivill X. and Arbones M. L. (2002) Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Mol Cell Biol* **22**, 6636-6647.

Franklin K. and Paxinos G. (1997) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego.

- Frick K. M., Stearns N. A., Pan J. Y. and Berger-Sweeney J. (2003) Effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry in middle-aged mice. *Learn Mem* **10**, 187-198.
- Fridovich I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **64**, 97-112.
- Frith U. and Frith C. D. (1974) Specific motor disabilities in Down's syndrome. *J Child Psychol Psychiatry* **15**, 293-301.
- Frussa-Filho R., Otoboni J. R., Uema F. T. and Sa-Rocha L. C. (1991) Evaluation of memory and anxiety in rats observed in the elevated plus-maze: effects of age and isolation. *Braz J Med Biol Res* **24**, 725-728.
- Fuchs J. L., Montemayor M. and Greenough W. T. (1990) Effect of environmental complexity on size of the superior colliculus. *Behav Neural Biol* **54**, 198-203.
- Gagne J., Gelinis S., Martinoli M. G., Foster T. C., Ohayon M., Thompson R. F., Baudry M. and Massicotte G. (1998) AMPA receptor properties in adult rat hippocampus following environmental enrichment. *Brain Res* **799**, 16-25.
- Galdzicki Z., Siarey R., Pearce R., Stoll J. and Rapoport S. I. (2001) On the cause of mental retardation in Down syndrome: extrapolation from full and segmental trisomy 16 mouse models. *Brain Res Brain Res Rev* **35**, 115-145.
- Garber P., Sinet P. M., Jerome H. and Lejeune J. (1979) Copper/zinc superoxide dismutase activity in trisomy 21 by translocation. *Lancet* **2**, 914-915.
- Gemus M., Palisano R., Russell D., Rosenbaum P., Walter S. D., Galuppi B. and Lane M. (2001) Using the gross motor function measure to evaluate motor development in children with Down syndrome. *Phys Occup Ther Pediatr* **21**, 69-79.
- George O., Vallee M., Le Moal M. and Mayo W. (2006) Neurosteroids and cholinergic systems: implications for sleep and cognitive processes and potential role of age-related changes. *Psychopharmacology (Berl)*, 1-12.
- Globus A., Rosenzweig M. R., Bennett E. L. and Diamond M. C. (1973) Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. *J Comp Physiol Psychol* **82**, 175-181.
- Granholt A. C., Sanders L. A. and Crnic L. S. (2000) Loss of cholinergic phenotype in basal forebrain coincides with cognitive decline in a mouse model of Down's syndrome. *Exp Neurol* **161**, 647-663.
- Greenough W. T. and Volkmar F. R. (1973) Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments. *Exp Neurol* **40**, 491-504.
- Griebel G., Belzung C., Misslin R. and Vogel E. (1993) The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs. *Behav Pharmacol* **4**, 637-644.
- Griffin W. S., Stanley L. C., Ling C., White L., MacLeod V., Perrot L. J., White C. L., 3rd and Araoz C. (1989) Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7611-7615.

- Groner Y., Avraham K. B., Schickler M., Yarom R. and Knobler H. (1990) Clinical symptoms of Down syndrome are manifested in transgenic mice overexpressing the human Cu/Zn-superoxide dismutase gene. *Prog Clin Biol Res* **360**, 233-262.
- Grossman S. D., Rosenberg L. J. and Wrathall J. R. (2001) Relationship of altered glutamate receptor subunit mRNA expression to acute cell loss after spinal cord contusion. *Exp Neurol* **168**, 283-289.
- Guimera J., Casas C., Estivill X. and Pritchard M. (1999) Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics* **57**, 407-418.
- Guimera J., Casas C., Pucharcos C., Solans A., Domenech A., Planas A. M., Ashley J., Lovett M., Estivill X. and 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. *Hum Mol Genet* **5**, 1305-1310.
- Gundersen H. J. and Jensen E. B. (1987) The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* **147 (Pt 3)**, 229-263.
- Guralnick M. J. (1998) Effectiveness of early intervention for vulnerable children: a developmental perspective. *Am J Ment Retard* **102**, 319-345.
- Gutteridge J. M. and Halliwell B. (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* **899**, 136-147.
- Gwack Y., Sharma S., Nardone J., Tanasa B., Iuga A., Srikanth S., Okamura H., Bolton D., Feske S., Hogan P. G. and Rao A. (2006) A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* **441**, 646-650.
- Gyure K. A., Durham R., Stewart W. F., Smialek J. E. and Troncoso J. C. (2001) Intraneuronal abeta-amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Arch Pathol Lab Med* **125**, 489-492.
- Haemisch A. and Gartner K. (1997) Effects of cage enrichment on territorial aggression and stress physiology in male laboratory mice. *Acta Physiol Scand Suppl* **640**, 73-76.
- Halpain S. (2000) Actin and the agile spine: how and why do dendritic spines dance? *Trends Neurosci* **23**, 141-146.
- Hammerle B., Vera-Samper E., Speicher S., Arencibia R., Martinez S. and 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.
- Hammerle B., Carnicero A., Elizalde C., Ceron J., Martinez S. and 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.
- Hampton T. G., Stasko M. R., Kale A., Amende I. and Costa A. C. (2004) Gait dynamics in trisomic mice: quantitative neurological traits of Down syndrome. *Physiol Behav* **82**, 381-389.
- Hardy J. (2002) Testing times for the "amyloid cascade hypothesis". *Neurobiol Aging* **23**, 1073-1074.
- Harkany T., Varga C., Grosche J., Mulder J., Luiten P. G., Hortobagyi T., Penke B. and Hartig W. (2002) Distinct subsets of nucleus basalis neurons exhibit similar sensitivity to excitotoxicity. *Neuroreport* **13**, 767-772.

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. and Yaspo M. L. (2000) The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* **405**, 311-319.

Hawkins B. A., Eklund S. J., James D. R. and Foote A. K. (2003) Adaptive behavior and cognitive function of adults with down syndrome: modeling change with age. *Ment Retard* **41**, 7-28.

Head E. and Lott I. T. (2004) Down syndrome and beta-amyloid deposition. *Curr Opin Neurol* **17**, 95-100.

Hebb D. (1949) *The biology of behavior*, New York.

Hellweg R., Gericke C. A., Jendroska K., Hartung H. D. and Cervos-Navarro J. (1998) NGF content in the cerebral cortex of non-demented patients with amyloid-plaques and in symptomatic Alzheimer's disease. *Int J Dev Neurosci* **16**, 787-794.

Himpel S., Panzer P., Eirnbter K., Czajkowska H., Sayed M., Packman L. C., Blundell T., Kentrup H., Grotzinger J., Joost H. G. and Becker W. (2001) Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A. *Biochem J* **359**, 497-505.

Hock C., Maddalena A., Raschig A., Muller-Spahn F., Eschweiler G., Hager K., Heuser I., Hampel H., Muller-Thomsen T., Oertel W., Wienrich M., Signorell A., Gonzalez-Agosti C. and Nitsch R. M. (2003) Treatment with the selective muscarinic m1 agonist talsaclidine decreases cerebrospinal fluid levels of A beta 42 in patients with Alzheimer's disease. *Amyloid* **10**, 1-6.

Hockly E., Cordery P. M., Woodman B., Mahal A., van Dellen A., Blakemore C., Lewis C. M., Hannan A. J. and Bates G. P. (2002) Environmental enrichment slows disease progression in R6/2 Huntington's disease mice. *Ann Neurol* **51**, 235-242.

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. and Mobley W. C. (1996) Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13333-13338.

Hunter C. L., Bimonte-Nelson H. A., Nelson M., Eckman C. B. and Granholm A. C. (2004) Behavioral and neurobiological markers of Alzheimer's disease in Ts65Dn mice: effects of estrogen. *Neurobiol Aging* **25**, 873-884.

Hunter C. L., Isacson O., Nelson M., Bimonte-Nelson H., Seo H., Lin L., Ford K., Kindy M. S. and Granholm A. C. (2003) Regional alterations in amyloid precursor protein and nerve growth factor across age in a mouse model of Down's syndrome. *Neurosci Res* **45**, 437-445.

Hyde L. A. and Crnic L. S. (2001) Age-related deficits in context discrimination learning in Ts65Dn mice that model Down syndrome and Alzheimer's disease. *Behav Neurosci* **115**, 1239-1246.

- Hyde L. A., Crnic L. S., Pollock A. and Bickford P. C. (2001) Motor learning in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Dev Psychobiol* **38**, 33-45.
- Hyman B. T., West H. L., Rebeck G. W., Buldyrev S. V., Mantegna R. N., Ukleja M., Havlin S. and Stanley H. E. (1995) Quantitative analysis of senile plaques in Alzheimer disease: observation of log-normal size distribution and molecular epidemiology of differences associated with apolipoprotein E genotype and trisomy 21 (Down syndrome). *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3586-3590.
- Inestrosa N. C., Alvarez A., Perez C. A., Moreno R. D., Vicente M., Linker C., Casanueva O. I., Soto C. and Garrido J. (1996) Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* **16**, 881-891.
- Inoue A. and Nakata Y. (2001) Strategy for modulation of central dopamine transmission based on the partial agonist concept in schizophrenia therapy. *Jpn J Pharmacol* **86**, 376-380.
- Isacson O. and Lin L. (2000) Cholinergic modulation of amyloid processing and dementia in animal models of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* **920**, 309-314.
- Jarrold C. and Baddeley A. D. (2001) Short-term memory in Down syndrome: applying the working memory model. *Downs Syndr Res Pract* **7**, 17-23.
- Jernigan T. L., Bellugi U., Sowell E., Doherty S. and Hesselink J. R. (1993) Cerebral morphologic distinctions between Williams and Down syndromes. *Arch Neurol* **50**, 186-191.
- Kang J. E., Choi S. A., Park J. B. and Chung K. C. (2005) Regulation of the proapoptotic activity of huntingtin interacting protein 1 by Dyrk1 and caspase-3 in hippocampal neuroprogenitor cells. *J Neurosci Res* **81**, 62-72.
- Kelly P. A. and Rahmani Z. (2005) DYRK1A enhances the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells by forming a complex with Ras, B-Raf, and MEK1. *Mol Biol Cell* **16**, 3562-3573.
- Kempermann G., Kuhn H. G. and Gage F. H. (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* **386**, 493-495.
- Kempermann G., Brandon E. P. and Gage F. H. (1998) Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol* **8**, 939-942.
- Kentrup H., Becker W., Heukelbach J., Wilmes A., Schurmann A., Huppertz C., Kainulainen H. and 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. *J Biol Chem* **271**, 3488-3495.
- Kim D., Won J., Shin D. W., Kang J., Kim Y. J., Choi S. Y., Hwang M. K., Jeong B. W., Kim G. S., Joe C. O., Chung S. H. and Song W. J. (2004) Regulation of Dyrk1A kinase activity by 14-3-3. *Biochem Biophys Res Commun* **323**, 499-504.
- Kim Y. T. and Wu C. F. (1987) Reversible blockage of neurite development and growth cone formation in neuronal cultures of a temperature-sensitive mutant of *Drosophila*. *J Neurosci* **7**, 3245-3255.
- Kohl Z., Kuhn H. G., Cooper-Kuhn C. M., Winkler J., Aigner L. and Kempermann G. (2002) Prewaning enrichment has no lasting effects on adult hippocampal neurogenesis in four-month-old mice. *Genes Brain Behav* **1**, 46-54.

- Kolb B. and Gibb R. (1990) Anatomical correlates of behavioural change after neonatal prefrontal lesions in rats. *Prog Brain Res* **85**, 241-255; discussion 255-246.
- Korenberg J. R., Chen X. N., Schipper R., Sun Z., Gonsky R., Gerwehr S., Carpenter N., Daumer C., Dignan P., Disteche C. and et al. (1994) Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4997-5001.
- Krasuski J. S., Alexander G. E., Horwitz B., Rapoport S. I. and Schapiro M. B. (2002) Relation of medial temporal lobe volumes to age and memory function in nondemented adults with Down's syndrome: implications for the prodromal phase of Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* **159**, 74-81.
- Kinstrie R., Lochhead P. A., Sibbet G., Morrice N. and Cleghon V. (2006) dDYRK2 and Minibrain interact with the chromatin remodelling factors SNR1 and TRX. *Biochem J*.
- Kubo M. and Ulrich B. (2006) Coordination of pelvis-HAT (head, arms and trunk) in anterior-posterior and medio-lateral directions during treadmill gait in preadolescents with/without Down syndrome. *Gait Posture* **23**, 512-518.
- Kurt M. A., Davies D. C., Kidd M., Dierssen M. and Florez J. (2000) Synaptic deficit in the temporal cortex of partial trisomy 16 (Ts65Dn) mice. *Brain Res* **858**, 191-197.
- Lahiri D. K., Farlow M. R., Nurnberger J. I., Jr. and Greig N. H. (1997) Effects of cholinesterase inhibitors on the secretion of beta-amyloid precursor protein in cell cultures. *Ann N Y Acad Sci* **826**, 416-421.
- Lawlor B. A., McCarron M., Wilson G. and McLoughlin M. (2001) Temporal lobe-oriented CT scanning and dementia in Down's syndrome. *Int J Geriatr Psychiatry* **16**, 427-429.
- Lazarov O., Robinson J., Tang Y. P., Hairston I. S., Korade-Mirnic Z., Lee V. M., Hersh L. B., Sapolsky R. M., Mirnic K. and Sisodia S. S. (2005) Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* **120**, 701-713.
- Le Marec N. and Lalonde R. (1997) Sensorimotor learning and retention during equilibrium tests in Purkinje cell degeneration mutant mice. *Brain Res* **768**, 310-316.
- Leggio M. G., Mandolesi L., Federico F., Spirito F., Ricci B., Gelfo F. and Petrosini L. (2005) Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res* **163**, 78-90.
- Lejeune J., Turpin R. and Gautier M. (1959) [Mongolism; a chromosomal disease (trisomy)]. *Bull Acad Natl Med* **143**, 256-265.
- Lendvai B., Stern E. A., Chen B. and Svoboda K. (2000) Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature* **404**, 876-881.
- Lin L., Georgievska B., Mattsson A. and Isacson O. (1999) Cognitive changes and modified processing of amyloid precursor protein in the cortical and hippocampal system after cholinergic synapse loss and muscarinic receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12108-12113.
- Liu Q., Kawai H. and Berg D. K. (2001) beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4734-4739.

- Lochhead P. A., Sibbet G., Morrice N. and Cleghon V. (2005) Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs. *Cell* **121**, 925-936.
- Lumbreras M., Baamonde C., Martinez-Cue C., Lubec G., Cairns N., Salles J., Dierssen M. and Florez J. (2006) Brain G protein-dependent signaling pathways in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Amino Acids*.
- Malenka R. C. and Nicoll R. A. (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* **285**, 1870-1874.
- Mao J., Maye P., Kogerman P., Tejedor F. J., Toftgard R., Xie W., Wu G. and Wu D. (2002) Regulation of Gli1 transcriptional activity in the nucleus by Dyrk1. *J Biol Chem* **277**, 35156-35161.
- Marin C., Parashos S. A., Kapitzoglou-Logothetis V., Peppe A. and Chase T. N. (1993) D1 and D2 dopamine receptor-mediated mechanisms and behavioral supersensitivity. *Pharmacol Biochem Behav* **45**, 195-200.
- Marin-Padilla M. (1972) Structural abnormalities of the cerebral cortex in human chromosomal aberrations: a Golgi study. *Brain Res* **44**, 625-629.
- Marin-Padilla M. (1976) Pyramidal cell abnormalities in the motor cortex of a child with Down's syndrome. A Golgi study. *J Comp Neurol* **167**, 63-81.
- Marti E., Altafaj X., Dierssen M., de la Luna S., Fotaki V., Alvarez M., Perez-Riba M., Ferrer I. and Estivill X. (2003) Dyrk1A expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system. *Brain Res* **964**, 250-263.
- Martinez-Cue C., Rueda N., Garcia E., Davisson M. T., Schmidt C. and Florez J. (2005) Behavioral, cognitive and biochemical responses to different environmental conditions in male Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Behav Brain Res* **163**, 174-185.
- Martinez-Cue C., Baamonde C., Lumbreras M., Paz J., Davisson M. T., Schmidt C., Dierssen M. and Florez J. (2002) Differential effects of environmental enrichment on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behav Brain Res* **134**, 185-200.
- Matsuo R., Ochiai W., Nakashima K. and Taga T. (2001) A new expression cloning strategy for isolation of substrate-specific kinases by using phosphorylation site-specific antibody. *J Immunol Methods* **247**, 141-151.
- Menendez M. (2004) Pathological and clinical heterogeneity of presenilin 1 gene mutations. *J Alzheimers Dis* **6**, 475-482.
- Mesulam M. M. (1986) Alzheimer plaques and cortical cholinergic innervation. *Neuroscience* **17**, 275-276.
- Mesulam M. M. (2004) The cholinergic innervation of the human cerebral cortex. *Prog Brain Res* **145**, 67-78.
- Meyer O. A., Tilson H. A., Byrd W. C. and Riley M. T. (1979) A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice. *Neurobehav Toxicol* **1**, 233-236.

- Mirochnitchenko O. and Inouye M. (1996) Effect of overexpression of human Cu,Zn superoxide dismutase in transgenic mice on macrophage functions. *J Immunol* **156**, 1578-1586.
- Mohammed A. H., Zhu S. W., Darmopil S., Hjerling-Leffler J., Ernfors P., Winblad B., Diamond M. C., Eriksson P. S. and Bogdanovic N. (2002) Environmental enrichment and the brain. *Prog Brain Res* **138**, 109-133.
- Moran M. A., Mufson E. J. and Gomez-Ramos P. (1993) Colocalization of cholinesterases with beta amyloid protein in aged and Alzheimer's brains. *Acta Neuropathol (Berl)* **85**, 362-369.
- Mori F., Lai C. C., Fusi F. and Giacobini E. (1995) Cholinesterase inhibitors increase secretion of APPs in rat brain cortex. *Neuroreport* **6**, 633-636.
- Morris A. F., Vaughan S. E. and Vaccaro P. (1982) Measurements of neuromuscular tone and strength in Down's syndrome children. *J Ment Defic Res* **26**, 41-46.
- Morris R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* **11**, 47-60.
- Mrak R. E., Griffin S. T. and Graham D. I. (1997) Aging-associated changes in human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**, 1269-1275.
- Mufson E. J., Conner J. M. and Kordower J. H. (1995) Nerve growth factor in Alzheimer's disease: defective retrograde transport to nucleus basalis. *Neuroreport* **6**, 1063-1066.
- Mufson E. J., Kroin J. S., Sendera T. J. and Sobreviela T. (1999) Distribution and retrograde transport of trophic factors in the central nervous system: functional implications for the treatment of neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol* **57**, 451-484.
- Mufson E. J., Lavine N., Jaffar S., Kordower J. H., Quirion R. and Saragovi H. U. (1997) Reduction in p140-TrkA receptor protein within the nucleus basalis and cortex in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **146**, 91-103.
- Mufson E. J., Ma S. Y., Dills J., Cochran E. J., Leurgans S., Wu J., Bennett D. A., Jaffar S., Gilmore M. L., Levey A. I. and Kordower J. H. (2002) Loss of basal forebrain P75(NTR) immunoreactivity in subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* **443**, 136-153.
- Muller D. M., Mendla K., Farber S. A. and Nitsch R. M. (1997) Muscarinic M1 receptor agonists increase the secretion of the amyloid precursor protein ectodomain. *Life Sci* **60**, 985-991.
- Mural R. J. and Adams M. D. and Myers E. W. and Smith H. O. and Miklos G. L. and Wides R. and Halpern A. and Li P. W. and Sutton G. G. and Nadeau J. and Salzberg S. L. and Holt R. A. and Kodira C. D. and Lu F. and Chen L. and Deng Z. and Evangelista C. C. and Gan W. and Heiman T. J. and Li J. and Li Z. and Merkulov G. V. and Milshina N. V. and Naik A. K. and Qi R. and Shue B. C. and Wang A. and Wang J. and Wang X. and Yan X. and Ye J. and Yooseph S. and Zhao Q. and Zheng L. and Zhu S. C. and Biddick K. and Bolanos R. and Delcher A. L. and Dew I. M. and Fasulo D. and Flanigan M. J. and Huson D. H. and Kravitz S. A. and Miller J. R. and Mobarry C. M. and Reinert K. and Remington K. A. and Zhang Q. and Zheng X. H. and Nusskern D. R. and Lai Z. and Lei Y. and Zhong W. and Yao A. and Guan P. and Ji R. R. and Gu Z. and Wang Z. Y. and Zhong F. and Xiao C. and Chiang C. C. and Yandell M. and Wortman J. R. and Amanatides P. G. and Hladun S. L. and Pratts E. C. and Johnson J. E. and Dodson K. L. and Woodford K. J. and Evans C. A. and Gropman B. and Rusch D. B. and Venter E. and Wang M. and Smith T. J. and Houck J. T. and Tompkins D. E.

and Haynes C. and Jacob D. and Chin S. H. and Allen D. R. and Dahlke C. E. and Sanders R. and Li K. and Liu X. and Levitsky A. A. and Majoros W. H. and Chen Q. and Xia A. C. and Lopez J. R. and Donnelly M. T. and Newman M. H. and Glodek A. and Kraft C. L. and Nodell M. and Ali F. and An H. J. and Baldwin-Pitts D. and Beeson K. Y. and Cai S. and Carnes M. and Carver A. and Caulk P. M. and Center A. and Chen Y. H. and Cheng M. L. and Coyne M. D. and Crowder M. and Danaher S. and Davenport L. B. and Desilets R. and Dietz S. M. and Doup L. and Dullaghan P. and Ferriera S. and Fosler C. R. and Gire H. C. and Gluecksmann A. and Gocayne J. D. and Gray J. and Hart B. and Haynes J. and Hoover J. and Howland T. and Ibegwam C. and Jalali M. and Johns D. and Kline L. and Ma D. S. and MacCawley S. and Magoon A. and Mann F. and May D. and McIntosh T. C. and Mehta S. and Moy L. and Moy M. C. and Murphy B. J. and Murphy S. D. and Nelson K. A. and Nuri Z. and Parker K. A. and Prudhomme A. C. and Puri V. N. and Qureshi H. and Raley J. C. and Reardon M. S. and Regier M. A. and Rogers Y. H. and Romblad D. L. and Schutz J. and Scott J. L. and Scott R. and Sitter C. D. and Smallwood M. and Sprague A. C. and Stewart E. and Strong R. V. and Suh E. and Sylvester K. and Thomas R. and Tint N. N. and Tsonis C. and Wang G. and Williams M. S. and Williams S. M. and Windsor S. M. and Wolfe K. and Wu M. M. and Zaveri J. and Chaturvedi K. and Gabrielian A. E. and Ke Z. and Sun J. and Subramanian G. and Venter J. C. and Pfannkoch C. M. and Barnstead M. and Stephenson L. D. (2002) A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome. *Science* **296**, 1661-1671.

Nadel L. (2003) Down's syndrome: a genetic disorder in biobehavioral perspective. *Genes Brain Behav* **2**, 156-166.

Naka F., Narita N., Okado N. and Narita M. (2005) Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment. *Brain Dev* **27**, 275-278.

Nelson L., Johnson J. K., Freedman M., Lott I., Groot J., Chang M., Milgram N. W. and Head E. (2005) Learning and memory as a function of age in Down syndrome: a study using animal-based tasks. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **29**, 443-453.

Niell C. M., Meyer M. P. and Smith S. J. (2004) In vivo imaging of synapse formation on a growing dendritic arbor. *Nat Neurosci* **7**, 254-260.

Nithianantharajah J., Levis H. and Murphy M. (2004) Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiol Learn Mem* **81**, 200-210.

Nitsch R. M., Slack B. E., Farber S. A., Borghesani P. R., Schulz J. G., Kim C., Felder C. C., Growdon J. H. and Wurtman R. J. (1993) Receptor-coupled amyloid precursor protein processing. *Ann N Y Acad Sci* **695**, 122-127.

Nixon R. A. (2005) Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* **26**, 373-382.

Nordberg A. (1992) Biological markers and the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* **139**, 54-58.

Okui M., Ide T., Morita K., Funakoshi E., Ito F., Ogita K., Yoneda Y., Kudoh J. and Shimizu N. (1999) High-level expression of the Mnb/Dyrk1A gene in brain and heart during rat early development. *Genomics* **62**, 165-171.

Oliver C., Crayton L., Holland A., Hall S. and Bradbury J. (1998) A four year prospective study of age-related cognitive change in adults with Down's syndrome. *Psychol Med* **28**, 1365-1377.

Olson L. E., Richtsmeier J. T., Leszl J. and Reeves R. H. (2004a) 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. and Reeves R. H. (2004b) Down syndrome mouse models Ts65Dn, Ts1Cje, and Ms1Cje/Ts65Dn exhibit variable severity of cerebellar phenotypes. *Dev Dyn* **230**, 581-589.

Ough B. R., Beatty W. w. and Khalili J. (1972) Effects of isolated and enriched rearing on response inhibition. *Psychomonic Science* **27**, 293-294.

Palisano R. J., Walter S. D., Russell D. J., Rosenbaum P. L., Gemus M., Galuppi B. E. and Cunningham L. (2001) Gross motor function of children with down syndrome: creation of motor growth curves. *Arch Phys Med Rehabil* **82**, 494-500.

Parker A. W. and Bronks R. (1980) Gait of children with Down syndrome. *Arch Phys Med Rehabil* **61**, 345-351.

Parker A. W., Bronks R. and Snyder C. W., Jr. (1986) Walking patterns in Down's syndrome. *J Ment Defic Res* **30 (Pt 4)**, 317-330.

Paylor R., Morrison S. K., Rudy J. W., Waltrip L. T. and Wehner J. M. (1992) Brief exposure to an enriched environment improves performance on the Morris water task and increases hippocampal cytosolic protein kinase C activity in young rats. *Behav Brain Res* **52**, 49-59.

Pelsman A., Hoyo-Vadillo C., Gudasheva T. A., Seredenin S. B., Ostrovskaya R. U. and Busciglio J. (2003) GVS-111 prevents oxidative damage and apoptosis in normal and Down's syndrome human cortical neurons. *Int J Dev Neurosci* **21**, 117-124.

Pellegrini-Calace M. and Tramontano A. (2006) Identification of a novel putative mitogen-activated kinase cascade on human chromosome 21 by computational approaches. *Bioinformatics* **22**, 775-778.

Perry E. K., Tomlinson B. E., Blessed G., Bergmann K., Gibson P. H. and Perry R. H. (1978) Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br Med J* **2**, 1457-1459.

Pisarska M., Mulchahey J. J., Welge J. A., Geraciotti T. D., Jr. and Kasckow J. W. (2000) Age-related alterations in emotional behaviors and amygdalar corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF-binding protein expression in aged Fischer 344 rats. *Brain Res* **877**, 184-190.

Prasher V., Farooq A. and Holder R. (2004) The Adaptive Behaviour Dementia Questionnaire (ABDQ): screening questionnaire for dementia in Alzheimer's disease in adults with Down syndrome. *Res Dev Disabil* **25**, 385-397.

Prasher V. P. (1995) Age-specific prevalence, thyroid dysfunction and depressive sintomatology in adults with Down syndrome and dementia. *International Journal of Geriatric Psychiatry* **10**, 25-31.

Prasher V. P., Chung M. C. and Haque M. S. (1998) Longitudinal changes in adaptive behavior in adults with Down syndrome: interim findings from a longitudinal study. *Am J Ment Retard* **103**, 40-46.

Prasher V. P., Robinson L., Krishnan V. H. and Chung M. C. (1995) Podiatric disorders among children with Down syndrome and learning disability. *Dev Med Child Neurol* **37**, 131-134.

Prinz M., Prinz B. and Schulz E. (1997) The growth of non-pyramidal neurons in the primary motor cortex of man: a Golgi study. *Histol Histopathol* **12**, 895-900.

- Prusky G. T., Reidel C. and Douglas R. M. (2000) Environmental enrichment from birth enhances visual acuity but not place learning in mice. *Behav Brain Res* **114**, 11-15.
- Pueschel S. M. (1990) Clinical aspects of Down syndrome from infancy to adulthood. *Am J Med Genet Suppl* **7**, 52-56.
- Purpura D. P. (1974) Dendritic spine "dysgenesis" and mental retardation. *Science* **186**, 1126-1128.
- Racchi M., Sironi M., Caprera A., Konig G. and Govoni S. (2001) Short- and long-term effect of acetylcholinesterase inhibition on the expression and metabolism of the amyloid precursor protein. *Mol Psychiatry* **6**, 520-528.
- Rahmani Z., Lopes C., Rachidi M. and Delabar J. M. (1998) Expression of the *mnb* (*dyrk*) protein in adult and embryonic mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **253**, 514-518.
- Rahmani Z., Blouin J. L., Creau-Goldberg N., Watkins P. C., Mattei J. F., Poissonnier M., Prieur M., Chettouh Z., Nicole A., Aurias A. and et al. (1989) Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5958-5962.
- Ralph R. J. and Caine S. B. (2005) Dopamine D1 and D2 agonist effects on prepulse inhibition and locomotion: comparison of Sprague-Dawley rats to Swiss-Webster, 129X1/SvJ, C57BL/6J, and DBA/2J mice. *J Pharmacol Exp Ther* **312**, 733-741.
- Rampon C., Jiang C. H., Dong H., Tang Y. P., Lockhart D. J., Schultz P. G., Tsien J. Z. and Hu Y. (2000) Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12880-12884.
- Rasmuson S., Olsson T., Henriksson B. G., Kelly P. A., Holmes M. C., Seckl J. R. and Mohammed A. H. (1998) Environmental enrichment selectively increases 5-HT_{1A} receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* **53**, 285-290.
- Raz N., Torres I. J., Briggs S. D., Spencer W. D., Thornton A. E., Loken W. J., Gunning F. M., McQuain J. D., Driesen N. R. and Acker J. D. (1995) Selective neuroanatomic abnormalities in Down's syndrome and their cognitive correlates: evidence from MRI morphometry. *Neurology* **45**, 356-366.
- Rees T. M., Berson A., Sklan E. H., Younkin L., Younkin S., Brimijoin S. and Soreq H. (2005) Memory deficits correlating with acetylcholinesterase splice shift and amyloid burden in doubly transgenic mice. *Curr Alzheimer Res* **2**, 291-300.
- Reeves R. H., Gearhart J. D. and Littlefield J. W. (1986) Genetic basis for a mouse model of Down syndrome. *Brain Res Bull* **16**, 803-814.
- Renner M. J. and Rosenzweig M. R. (1987) The golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*) as a model for the effects of environmental enrichment in solitary animals. *Dev Psychobiol* **20**, 19-24.
- Restivo L., Ferrari F., Passino E., Sgobio C., Bock J., Oostra B. A., Bagni C. and Ammassari-Teule M. (2005) Enriched environment promotes behavioral and morphological recovery in a mouse model for the fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11557-11562.
- Richtsmeier J. T., Zumwalt A., Carlson E. J., Epstein C. J. and Reeves R. H. (2002) Craniofacial phenotypes in segmentally trisomic mouse models for Down syndrome. *Am J Med Genet* **107**, 317-324.

- Robertson Ringenbach S. D., Chua R., Maraj B. K., Kao J. C. and Weeks D. J. (2002) Bimanual coordination dynamics in adults with Down syndrome. *Motor Control* **6**, 388-407.
- Rogers D. C., Fisher E. M., Brown S. D., Peters J., Hunter A. J. and Martin J. E. (1997) Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome* **8**, 711-713.
- Roizen N. J. and Patterson D. (2003) Down's syndrome. *Lancet* **361**, 1281-1289.
- Roper R. J., St John H. K., Philip J., Lawler A. and Reeves R. H. (2006) Perinatal loss of Ts65Dn Down syndrome mice. *Genetics* **172**, 437-443.
- Rosenzweig M. R. and Bennett E. L. (1972) Cerebral changes in rats exposed individually to an enriched environment. *J Comp Physiol Psychol* **80**, 304-313.
- Rossner S., Ueberham U., Schliebs R., Perez-Polo J. R. and Bigl V. (1998) The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling. *Prog Neurobiol* **56**, 541-569.
- Roubertoux P. L., Bichler Z., Pinoteau W., Jamon M., Seregaza Z., Smith D. J., Rubin E. and Migliore-Samour D. (2006) Pre-weaning Sensorial and Motor Development in Mice Transpolygenic for the Critical Region of Trisomy 21. *Behav Genet* **36**, 377-386.
- Rowe W. B., Sprekmeester E., Meaney M. J., Quirion R. and Rochford J. (1998) Reactivity to novelty in cognitively-impaired and cognitively-unimpaired aged rats and young rats. *Neuroscience* **83**, 669-680.
- Roy V., Belzung C., Delarue C. and Chapillon P. (2001) Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Physiol Behav* **74**, 313-320.
- Sago H., Carlson E. J., Smith D. J., Rubin E. M., Crnic L. S., Huang T. T. and Epstein C. J. (2000) Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome. *Pediatr Res* **48**, 606-613.
- Sago H., Carlson E. J., Smith D. J., Kilbridge J., Rubin E. M., Mobley W. C., Epstein C. J. and Huang T. T. (1998) Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6256-6261.
- Saito S., Kobayashi S., Ohashi Y., Igarashi M., Komiya Y. and Ando S. (1994) Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin contents. *J Neurosci Res* **39**, 57-62.
- Salehi A., Delcroix J. D. and Swaab D. F. (2004) Alzheimer's disease and NGF signaling. *J Neural Transm* **111**, 323-345.
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sawa A. (2001) Alteration of gene expression in Down's syndrome (DS) brains: its significance in neurodegeneration. *J Neural Transm Suppl*, 361-371.
- Scott S. A., Mufson E. J., Weingartner J. A., Skau K. A. and Crutcher K. A. (1995) Nerve growth factor in Alzheimer's disease: increased levels throughout the brain coupled with declines in nucleus basalis. *J Neurosci* **15**, 6213-6221.
- Schulz E. and Scholz B. (1992) Neurohistological findings in the parietal cortex of children with chromosome aberrations. *J Hirnforsch* **33**, 37-62.

- Seo H. and Isacson O. (2005) Abnormal APP, cholinergic and cognitive function in Ts65Dn Down's model mice. *Exp Neurol* **193**, 469-480.
- Seo J., Kim S., Kim H., Park C. H., Jeong S., Lee J., Choi S. H., Chang K., Rah J., Koo J., Kim E. and Suh Y. (2001) Effects of nicotine on APP secretion and Abeta- or CT(105)-induced toxicity. *Biol Psychiatry* **49**, 240-247.
- Shapiro B. L. (1999) The Down syndrome critical region. *J Neural Transm Suppl* **57**, 41-60.
- Sherman S. L., Petersen M. B., Freeman S. B., Hersey J., Pettay D., Taft L., Frantzen M., Mikkelsen M. and Hassold T. J. (1994) Non-disjunction of chromosome 21 in maternal meiosis I: evidence for a maternal age-dependent mechanism involving reduced recombination. *Hum Mol Genet* **3**, 1529-1535.
- Shim K. S. and Lubec G. (2002) Drebrin, a dendritic spine protein, is manifold decreased in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neurosci Lett* **324**, 209-212.
- Shindoh N., Kudoh J., Maeda H., Yamaki A., Minoshima S., Shimizu Y. and Shimizu N. (1996) Cloning of a human homolog of the Drosophila minibrain/rat Dyrk gene from "the Down syndrome critical region" of chromosome 21. *Biochem Biophys Res Commun* **225**, 92-99.
- Shultz J., Aman M., Kelbley T., LeClear Wallace C., Burt D. B., Primeaux-Hart S., Loveland K., Thorpe L., Bogos E. S., Timon J., Patti P. and Tsiouris J. (2004) Evaluation of screening tools for dementia in older adults with mental retardation. *Am J Ment Retard* **109**, 98-110.
- Siarey R. J., Stoll J., Rapoport S. I. and Galdzicki Z. (1997) Altered long-term potentiation in the young and old Ts65Dn mouse, a model for Down Syndrome. *Neuropharmacology* **36**, 1549-1554.
- Singh Rao S. K., Neal J. W. and Newman G. R. (1993) Corpora amylacea could be an indicator of neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* **19**, 269-276.
- Sirevaag A. M., Black J. E. and Greenough W. T. (1991) Astrocyte hypertrophy in the dentate gyrus of young male rats reflects variation of individual stress rather than group environmental complexity manipulations. *Exp Neurol* **111**, 74-79.
- Sitz J. H., Tigges M., Baumgartel K., Khaspekov L. G. and Lutz B. (2004) Dyrk1A potentiates steroid hormone-induced transcription via the chromatin remodeling factor Arip4. *Mol Cell Biol* **24**, 5821-5834.
- Skurat A. V. and Dietrich A. D. (2004) Phosphorylation of Ser640 in muscle glycogen synthase by DYRK family protein kinases. *J Biol Chem* **279**, 2490-2498.
- Smith D. J., Zhu Y., Zhang J., Cheng J. F. and Rubin E. M. (1995) Construction of a panel of transgenic mice containing a contiguous 2-Mb set of YAC/P1 clones from human chromosome 21q22.2. *Genomics* **27**, 425-434.
- 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. and 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.
- Smith M. A., Drew K. L., Nunomura A., Takeda A., Hirai K., Zhu X., Atwood C. S., Raina A. K., Rottkamp C. A., Sayre L. M., Friedland R. P. and Perry G. (2002) Amyloid-beta, tau alterations and mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease: the chickens or the eggs? *Neurochem Int* **40**, 527-531.

- Sofroniew M. V., Howe C. L. and Mobley W. C. (2001) Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* **24**, 1217-1281.
- Song W. J., Sternberg L. R., Kasten-Sportes C., Keuren M. L., Chung S. H., Slack A. C., Miller D. E., Glover T. W., Chiang P. W., Lou L. and Kurnit D. M. (1996) Isolation of human and murine homologues of the Drosophila minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome "critical region". *Genomics* **38**, 331-339.
- Spires T. L., Grote H. E., Varshney N. K., Cordery P. M., van Dellen A., Blakemore C. and Hannan A. J. (2004a) Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism. *J Neurosci* **24**, 2270-2276.
- Spires T. L., Grote H. E., Garry S., Cordery P. M., Van Dellen A., Blakemore C. and Hannan A. J. (2004b) Dendritic spine pathology and deficits in experience-dependent dendritic plasticity in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. *Eur J Neurosci* **19**, 2799-2807.
- Star E. N., Kwiatkowski D. J. and Murthy V. N. (2002) Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci* **5**, 239-246.
- Steimer T., Escorihuela R. M., Fernandez-Teruel A. and Driscoll P. (1998) Long-term behavioural and neuroendocrine changes in Roman high-(RHA/Verh) and low-(RLA-Verh) avoidance rats following neonatal handling. *Int J Dev Neurosci* **16**, 165-174.
- Sterio D. C. (1984) The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* **134 (Pt 2)**, 127-136.
- Strauss D. and Zigman W. B. (1996) Behavioral capabilities and mortality risk in adults with and without Down syndrome. *Am J Ment Retard* **101**, 269-281.
- Strittmatter W. J., Weisgraber K. H., Huang D. Y., Dong L. M., Salvesen G. S., Pericak-Vance M., Schmechel D., Saunders A. M., Goldgaber D. and Roses A. D. (1993) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8098-8102.
- Strittmatter W. J., Saunders A. M., Goedert M., Weisgraber K. H., Dong L. M., Jakes R., Huang D. Y., Pericak-Vance M., Schmechel D. and Roses A. D. (1994) Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11183-11186.
- Suetsugu M. and Mehraein P. (1980) Spine distribution along the apical dendrites of the pyramidal neurons in Down's syndrome. A quantitative Golgi study. *Acta Neuropathol (Berl)* **50**, 207-210.
- Tada T. and Sheng M. (2006) Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 95-101.
- Takashima S., Ieshima A., Nakamura H. and Becker L. E. (1989) Dendrites, dementia and the Down syndrome. *Brain Dev* **11**, 131-133.
- Takashima S., Iida K., Mito T. and Arima M. (1994) Dendritic and histochemical development and ageing in patients with Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res* **38 (Pt 3)**, 265-273.
- Tees R. C., Buhmann K. and Hanley J. (1990) The effect of early experience on water maze spatial learning and memory in rats. *Dev Psychobiol* **23**, 427-439.

- Teipel S. J. and Hampel H. (2006) Neuroanatomy of Down Syndrome in vivo: A Model of Preclinical Alzheimer's Disease. *Behav Genet*.
- Teipel S. J., Schapiro M. B., Alexander G. E., Krasuski J. S., Horwitz B., Hoehne C., Moller H. J., Rapoport S. I. and Hampel H. (2003) Relation of corpus callosum and hippocampal size to age in nondemented adults with Down's syndrome. *Am J Psychiatry* **160**, 1870-1878.
- Tejedor F., Zhu X. R., Kaltenbach E., Ackermann A., Baumann A., Canal I., Heisenberg M., Fischbach K. F. and Pongs O. (1995) minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in Drosophila. *Neuron* **14**, 287-301.
- Thinakaran G. and Parent A. T. (2004) Identification of the role of presenilins beyond Alzheimer's disease. *Pharmacol Res* **50**, 411-418.
- Toni N., Buchs P. A., Nikonenko I., Bron C. R. and Muller D. (1999) LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* **402**, 421-425.
- Topka H., Massaquoi S. G., Benda N. and Hallett M. (1998) Motor skill learning in patients with cerebellar degeneration. *J Neurol Sci* **158**, 164-172.
- Tou J. C. and Wade C. E. (2002) Determinants affecting physical activity levels in animal models. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**, 587-600.
- Treit D., Menard J. and Royan C. (1993) Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* **44**, 463-469.
- Trullas R. and Skolnick P. (1993) Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* **111**, 323-331.
- Utsuki T., Shoab M., Holloway H. W., Ingram D. K., Wallace W. C., Haroutunian V., Sambamurti K., Lahiri D. K. and Greig N. H. (2002) Nicotine lowers the secretion of the Alzheimer's amyloid beta-protein precursor that contains amyloid beta-peptide in rat. *J Alzheimers Dis* **4**, 405-415.
- Uylings H. B., Kuypers K., Diamond M. C. and Veltman W. A. (1978) Effects of differential environments on plasticity of dendrites of cortical pyramidal neurons in adult rats. *Exp Neurol* **62**, 658-677.
- van de Weerd H. A., Baumans V., Koolhaas J. M. and van Zutphen L. F. (1994) Strain specific behavioural response to environmental enrichment in the mouse. *J Exp Anim Sci* **36**, 117-127.
- van Praag H., Kempermann G. and Gage F. H. (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* **1**, 191-198.
- van Praag H., Christie B. R., Sejnowski T. J. and Gage F. H. (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13427-13431.
- Vázquez J. (2001) *Educación física de base y actividades lúdicas*. Flórez, J. Troncoso, M.V., Barcelona.
- Vicari S. (2006) Motor development and neuropsychological patterns in persons with down syndrome. *Behav Genet* **36**, 355-364.

- Villa A., Latasa M. J. and Pascual A. (2001) Nerve growth factor modulates the expression and secretion of beta-amyloid precursor protein through different mechanisms in PC12 cells. *J Neurochem* **77**, 1077-1084.
- Visser F. E., Kuilman M., Oosing J., Overweg J., van Wijk J. and van Huffelen A. C. (1996) Use of electroencephalography to detect Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Acta Neurol Scand* **94**, 97-103.
- Visser F. E., Aldenkamp A. P., van Huffelen A. C., Kuilman M., Overweg J. and van Wijk J. (1997) Prospective study of the prevalence of Alzheimer-type dementia in institutionalized individuals with Down syndrome. *Am J Ment Retard* **101**, 400-412.
- Voikar V., Koks S., Vasar E. and Rauvala H. (2001) Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol Behav* **72**, 271-281.
- von Bohlen Und Halbach O., Zacher C., Gass P. and Unsicker K. (2006) Age-related alterations in hippocampal spines and deficiencies in spatial memory in mice. *J Neurosci Res* **83**, 525-531.
- von Groote-Bidlingmaier F., Schmolli D., Orth H. M., Joost H. G., Becker W. and Barthel A. (2003) DYRK1 is a co-activator of FKHR (FOXO1a)-dependent glucose-6-phosphatase gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 764-769.
- Vuksic M., Petanjek Z., Rasin M. R. and Kostovic I. (2002) Perinatal growth of prefrontal layer III pyramids in Down syndrome. *Pediatr Neurol* **27**, 36-38.
- Wainwright P. E., Levesque S., Krempulec L., Bulman-Fleming B. and McCutcheon D. (1993) Effects of environmental enrichment on cortical depth and Morris-maze performance in B6D2F2 mice exposed prenatally to ethanol. *Neurotoxicol Teratol* **15**, 11-20.
- Wang C., Chua K., Seghezzi W., Lees E., Gozani O. and Reed R. (1998) Phosphorylation of spliceosomal protein SAP 155 coupled with splicing catalysis. *Genes Dev* **12**, 1409-1414.
- 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. and Hwang Y. W. (2004) Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain. *Brain Res* **1010**, 69-80.
- Wiechmann S., Czajkowska H., de Graaf K., Grotzinger J., Joost H. G. and Becker W. (2003) Unusual function of the activation loop in the protein kinase DYRK1A. *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 403-408.
- Williams C. L., Barnett A. M. and Meck W. H. (1990) Organizational effects of early gonadal secretions on sexual differentiation in spatial memory. *Behav Neurosci* **104**, 84-97.
- Wolfe M. S., De Los Angeles J., Miller D. D., Xia W. and Selkoe D. J. (1999) Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **38**, 11223-11230.
- Wolfer D. P., Madani R., Valenti P. and Lipp H. P. (2001) Extended analysis of path data from mutant mice using the public domain software Wintrack. *Physiol Behav* **73**, 745-753.
- Woods Y. L., Cohen P., Becker W., Jakes R., Goedert M., Wang X. and Proud C. G. (2001a) The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem J* **355**, 609-615.

- Woods Y. L., Rena G., Morrice N., Barthel A., Becker W., Guo S., Unterman T. G. and Cohen P. (2001b) The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site. *Biochem J* **355**, 597-607.
- Yang E. J., Ahn Y. S. and Chung K. C. (2001) Protein kinase Dyrk1 activates cAMP response element-binding protein during neuronal differentiation in hippocampal progenitor cells. *J Biol Chem* **276**, 39819-39824.
- Yankner B. A. (1996) New clues to Alzheimer's disease: unraveling the roles of amyloid and tau. *Nat Med* **2**, 850-852.
- Yokoi T., Lovett M., Cheng Z. Y. and Epstein C. J. (1986) Isolation of transcribed DNA sequences from chromosome 21 using mouse fetal cDNA. *Hum Genet* **74**, 137-142.
- Zaharia M. D., Kulczycki J., Shanks N., Meaney M. J. and Anisman H. (1996) The effects of early postnatal stimulation on Morris water-maze acquisition in adult mice: genetic and maternal factors. *Psychopharmacology (Berl)* **128**, 227-239.
- Zhang X. (2004) Cholinergic activity and amyloid precursor protein processing in aging and Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**, 137-152.
- Zhu J., Apparsundaram S., Bardo M. T. and Dwoskin L. P. (2005) Environmental enrichment decreases cell surface expression of the dopamine transporter in rat medial prefrontal cortex. *J Neurochem* **93**, 1434-1443.
- Zuchner T., Perez-Polo J. R. and Schliebs R. (2004) Beta-secretase BACE1 is differentially controlled through muscarinic acetylcholine receptor signaling. *J Neurosci Res* **77**, 250-257.

ANEXO



1. ABREVIATURAS

AAMR	Asociación Americana sobre Retraso Mental
Ab	péptido β -amiloide
AChE	acetilcolinesterasa
AMPA	<i>aminomethyl-phosphonic acid</i>
AMPc	Adenosín 3'-5'-monofosfato cíclico
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BACE2	<i>beta-site APP cleaving enzyme 2</i>
ChAT	colinacetil transferasa
cm	centímetro
CREB	<i>CAMP Response Element Binding Protein</i>
D1	receptor dopaminérgico D1
D2	receptor dopaminérgico D2
DA	dopamina
DAB	diaminobenzidina
db	decibelio
DIV	día in vitro
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	ácido desoxiribonucleico
DOPAC	<i>3,4-Dihydroxy-Phenylacetic Acid</i>
DSCR	región crítica del síndrome Down
DYRK1A	<i>Dual specificity Yak1- Related Kinase</i>
EA	enfermedad de Alzheimer
FRAP	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>
GFP	<i>Green Fluorescence Protein</i>
GSK3	<i>Glycogen Synthase Kinase 3</i>
h	hora
HSA21	cromosoma 21 humano
kb	kilobase
kDa	kilo dalton
LTD	<i>long term depotentiation</i>
LTP	<i>long term potentiation</i>

M	molar
mA	miliamperio
Mb	megabase
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
Mnb	minibrain
MPTP	<i>1-methyl 4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine</i>
MSN	núcleo septal medial
MWM	Morris water maze, laberinto acuático
NB ⁺⁺	medio neurobasal suplementado
NFAT	<i>Nuclear Factor Activated Thimocyte</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NMDA	N-metil D-aspartato
P75	receptor de baja afinidad para NGF
PBS	tampón fosfato salino
PBS-T	tampón fosfato salino con tritón 0.2%
PBS-T-GEL	PBS-T con gelatina al 0.25%
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PET	tomografía de emisión de positrones
PFA	paraformaldehído
PPA	proteína precursora de β -amiloide
RNA	ácido ribonucléico
ROI	región de interés
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SD	síndrome de Down
SMART	<i>System Motor Activity Record and Tracking</i>
SNC	sistema nervioso central
SNpc	sustantia nigra pars compacta
SNr	sustantia nigra reticulata
SOD1	Cu/Zn superóxido dismutasa
ST	estriado

SUV	<i>Standard Uptake Value</i> , valor de captación normalizado
TA	temperatura ambiente
TrkA	receptor tirosin kinasa A
V	voltio
VDB	banda diagonal vertical
VTA	área tegmental ventral
YAC	<i>Yeast Artificial Chromosome</i>

2. ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

Esta tesis ha dado lugar a los siguientes artículos:

Martínez de Lagrán M, Altafaj X, Gallego X, Martí E, Estivill X, Sahún I, Fillat C, Dierssen M "Motor phenotypic alterations in TgDyrk1A transgenic mice implicate DYRK1A in Down syndrome motor dysfunction." *Neurobiology of Disease* 15: 132-142, 2004

Fotaki V, **Martínez de Lagrán M**, Estivill X, Arbonés M, Dierssen Haploinsufficiency of Dyrk1A in mice leads to specific alterations in the development and regulation of motor activity. *Behavioral Neuroscience* 118 (4): 815-21, 2004

Ferrer I, Barrachina M, Puig B, **Martínez de Lagrán M**, Martí E, Gómez-Isla T, Avila J, Dierssen M. Constitutive Dyrk1A is abnormally expressed in Alzheimer disease, Down syndrome, Dementia with Lewy bodies, Pick disease and related transgenic models. *Neurobiology of Disease* 20(2); 392-400, 2005

Martínez de Lagrán M, Bortolozzi A, Millán O, Gispert JJ, Arbonés M, González JR, Artigas F, Dierssen M. Dopaminergic deficiency in a dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1A heterozygous mice (Dyrk1A^{+/-}). *Genes, Brain and Behavior* (aceptado bajo revisión menor)

Además durante estos años se ha participado en la redacción de las siguientes revisiones científicas:

Benavides-Piccione R, Ballesteros I, **Martínez de Lagrán M**, Elston G, Estivill X, Fillat C, DeFelipe J, Dierssen M. On dendrites in Down syndrome and DS murine models: a spiny way to learn. *Progress in Neurobiology* 74:111-126, 2004

Dierssen M, Ortiz Abalia J, Arqué G, **Martínez de Lagrán M**, Fillat C. Pitfalls and hopes in Down syndrome Therapeutic approaches: In the search for evidence-based treatments *Behavioural Genetics*, 2006 (epub ahead of print)

Dierssen M, **Martínez de Lagrán M**. DYRK1A (dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1A): a gene with dosage effect during development and neurogenesis. *TSW development* (en prensa)

Otros trabajos en los que se ha colaborado:

Dierssen M, Fotaki V, **Martínez de Lagrán M**, Gratacòs M, Fillat C, Estivill X. Neurobehavioral development of two mouse lines commonly used in transgenic studies. *Pharmacological Biochemical Behavior* 73(1):19-25, 2002

Benavides-Piccione R, Elston GN, Arbones ML, **Martínez de Lagrán M**, Fotaki V, Estivill X, DeFelipe J, Dierssen M. Alterations in the phenotype of neocortical pyramidal cells in the DYRK1A^{+/-} mouse. *Neurobiology of Disease* 20(1):115-122, 2005

Dierssen M, Gratacòs M, Sahún I, Martín M, Armengol L, Gallego X, Amador-Arjona A, **Martínez de Lagrán M**, Murtra P, Pujana MA, Ferrer I, Martínez-Cué C, Flórez J, Maldonado R, Fillat C, Estivill X. Overexpression of NTRK3 Increases Anxiety-Like Behavior and Alters Monoaminergic Circuits in Mice. *Neurobiology of Disease* (bajo revisión)

A continuación se adjuntan los artículos más relevantes para el trabajo presentado en esta Tesis Doctoral



ELSEVIER

Motor phenotypic alterations in TgDyrk1a transgenic mice implicate DYRK1A in Down syndrome motor dysfunction

M. Martínez de Lagrán,^a X. Altafaj,^{a,1} X. Gallego,^a E. Martí,^a X. Estivill,^{a,b} I. Sahún,^a C. Fillat,^a and M. Dierssen^{a,*}

^aProgramme of Genes and Disease, Center for Genomic Regulation, 08003 Barcelona, Spain

^bLife Sciences and Health Department, Pompeu Fabra University, 08003 Barcelona, Spain

Received 13 March 2003; revised 16 September 2003; accepted 8 October 2003

Motor deficits are among the most frequent impairments in Down syndrome (DS), but their neuropathological and molecular bases remain elusive. Here we investigate the motor profile of transgenic mice overexpressing *Dyrk1a*, Tg(Dyrk1a)1Cff (hereafter TgDyrk1a), a candidate gene hypothesized to cause some of the neurological defects associated with DS. We have previously shown DYRK1A expression in the cerebellum and functionally related structures, most brainstem motor nuclei and spinal cord, supporting a role for *Dyrk1a* in controlling motor function. Here we demonstrate that TgDyrk1a mice present *DYRK1A* overexpression in these areas along with specific motor dysfunction. The main finding that emerged was impairment of motor learning and alteration of the organization of locomotor behavior, which agrees with reported clinical observations in subjects with DS. These results confirm and extend previous data and provide further insight to the functional domains that might be altered in TgDyrk1a mice and underlying molecular mechanisms of DS motor dysfunction.

© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Down syndrome; *Dyrk1a*; Motor dysfunction; DYRK1A expression; Motor learning; Transgenic mice; Locomotion

Introduction

Down syndrome (DS) is a genetic disorder caused by trisomy of all or part of human Chromosome 21 (HSA21). The neurological and neurosensory phenotypes of individuals with DS are variable and complex (Haslam, 1995). Besides presenting different degrees of mental deficit, there is a high prevalence and functional consequences of motor dysfunction among persons with DS. This motor dysfunction manifests shortly after birth as hypotonia of moderate intensity in infants, improves significantly after 1 year of age, and may be accompanied by hyporeflexia and reduced

muscular strength (Davis and Kelso, 1982; Morris et al., 1982; Palisano et al., 2001). More noticeable in children, these deficits seem to be closely associated with developmental delays in gross and fine motor skills (Shumway-Cook and Woollacott, 1985; Nadel, 2003; Gemus et al., 2001). Whereas some aspects of gross motor function show age-related changes with delayed but regular acquisitions, all the aspects of fine motor skills assessed seem to be more severely impaired and show little changes with age (Spano et al., 1999). In adults with DS, the motor dysfunction has been defined as disturbances in striate muscle control, which are frequently called “clumsiness.” It has been suggested that some movement characteristics considered aberrant in adults with DS may reflect adaptive strategies because early studies could not find major qualitative deficits in the motor control mechanisms of individuals with DS (Latash and Corcos, 1991). However, recent reports indicate that the motor alterations in DS are not unidimensional, and besides changes in general activity and coordination, other motor-related aspects, such as increased time for feedback adjustments in grip force and higher static grip forces and hand asymmetries in unimanual tasks, can be observed (Cole et al., 1988; Robertson Ringenbach et al., 2002). The origin of these motor alterations has tentatively been attributed to cerebellar dysfunction (Frith and Frith, 1974), but problems with proper modulation of motor commands may also be present.

Data from the study of mouse models of DS have revealed an important motor dysfunction in mice with segmental trisomy of mouse Chromosome 16 (Ts65Dn). In these mice, which contain the complete HSA21 DS critical region homologous of mouse Chromosome 16 (MMU16), hyperactivity, abnormal exploratory patterns, altered motor learning, and retarded neurodevelopment have been reported (Costa et al., 1999; Holtzman et al., 1996; Hyde et al., 2001a,b). However, subtraction of the region between *App* and *Sod1*, as occurs in another segmentally trisomic mouse, the Ts1Cje (Sago et al., 2000), produces a hypoactive phenotype, and finally a mouse trisomy limited to this *App-Sod1* region has a normal pattern of general activity. These evidences point to specific genes affecting motor phenotypes rather than the unspecific effect of the amount of extra genetic material, thus supporting the gene-dosage hypothesis (for a review, see Pritchard and Kola, 1999; Dierssen, 2003).

To identify specific genes related to pathophysiological features, it is necessary to use single gene transgenesis as a tool.

* Corresponding author. Programme of Genes and Disease, Center for Genomic Regulation, Passeig Marítim 37-49, 08003 Barcelona, Spain. Fax: +34-93224-08-99.

E-mail address: mara.dierssen@crg.es (M. Dierssen).

¹ Present address: Laboratoire Canaux Ioniques Et Signalisation, INSERM EMI 9931, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France.

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

DYRK1A has been considered a good candidate gene for the DS phenotypic abnormalities due to its localization in the DS critical region on HSA21 (Guimera et al., 1996) and its involvement in central nervous system development (Fotaki et al., 2002; Tejedor et al., 1995). The possible involvement of *DYRK1A* in the motor dysfunction observed in DS is supported by previous reports on animal models with overexpression or dose reduction of the gene. The fly *DYRK1A* orthologue is *minibrain* (*mnb*). Mutant flies with *mnb* dose reduction exhibit a decrease in the size of central brain hemispheres and optic lobes and abnormal behavior in tests that evaluate locomotor activity, visual acuity, and olfactory learning (Tejedor et al., 1995). The mouse *Dyrk1a* gene maps on Chromosome 16 (MMU16) in the region of orthology with HSA21 (Song et al., 1996), which is triplicated in Ts65Dn and Ts1Cje mice. Transgenic mice for human genomic fragments of human Chromosome 21q22.2 implicate *DYRK1A* in specific motor and cognitive defects (Smith et al., 1997), and haploinsufficiency of *Dyrk1a* in mouse leads to a marked hypoactivity (Fotaki et al., 2002). We have generated a transgenic mouse model overexpressing *Dyrk1a* in which neuromotor development delays, motor abnormalities, and cognitive deficits have been recently demonstrated (Altafaj et al., 2001). Although these observations make of *Dyrk1a* a good candidate to be responsible for an aberrant development of the brain with consequences in the acquisition of motor abilities, these studies have not precisely dissected the specific alterations. In the present work, we have used a series of informative and complementary assessments to evaluate different modalities of motor function in TgDyrk1a. These quantitative or semiquantitative experimental methods involved the analysis of gait patterns, maximum running speeds, rotarod performance, grip forces, swim paths, and swimming speeds. Significant levels of motor dysfunction were revealed in TgDyrk1a mice by specific tests, being more severely affected by those tasks involving a high degree of coordination, motor learning, and organization of locomotor behavior. Such results agree with the observations made in individuals with DS and further confirm the importance of single gene transgenesis in unraveling the involvement of individual genes in specific phenotypes.

Methods

Animals

The production of mice transgenic for *Dyrk1a* (TgDyrk1a) has previously been described (Altafaj et al., 2001). The transgene was inserted into C57BL/6JXSJL (Charles River, Barcelona, Spain) embryos and the stock is maintained by intercrossing wild-type and transgenic mice derived from the original founder. Two lines of transgenic mice with insertion of the transgene in different chromosomes were used to exclude positional effects. The nontransgenic littermates of TgDyrk1a mice served as controls. Same-sex littermates were group housed under a 12:12-h light–dark schedule (lights on at 9:00 a.m.) in controlled environmental conditions of humidity (60%) and temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) with free access to food and water. Only males were tested in this study, so females could be spared for breeding purposes. For most experiments, 13 TgDyrk1a and 10 control animals were tested at 12–14 months of age. A period of 1 week elapsed between each series of experiments. In the first series of experiments (Days 1–5), physical characteristics such as body

weight and the presence of bald patches were registered. In these series, neurological, sensorimotor, and general activity tests were performed (age range: 12–14 months). At the end of the initial series of experiments, the rotating rod test was carried out. The swimming tests were performed 2 months after the completion of these initial tests and involved about part of the same mice (age range: 14–16 months). The treadmill experiment was performed in a separate group of 14 TgDyrk1a and 10 controls (age: 3 months). All the behavioral testing was conducted by the same experimenter in an isolated room and at the same time of the day. Behavioral experimenters were blinded as to the genetic status of the animals. All experimental protocols involving the use of animals were performed in accordance with recommendations for the proper care and use of laboratory animals and were approved by the local Ethical Committee.

Immunohistochemistry

Mice were anaesthetized and perfused transcardially with PBS, followed by buffered 4% paraformaldehyde in PBS. At least three animals were used per time point. Brains were removed from the skull and postfixed in the same fixative for 24 h. After rinsing in PBS, brains of adult mice were cryoprotected in 30% sucrose and kept frozen at -70°C . Coronal sections 30 μm thick were cut with a cryostat, kept in cryoprotector, and stored at -20°C until use.

Sections were processed for Dyrk1a immunohistochemistry using the avidin–biotin–peroxidase method (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories). The sections were washed several times in PBS before peroxidase blocking. This was followed by incubation with PBS containing 0.2% Triton X-100, 10% FCS, and 0.25% gelatin for 1 h at room temperature. Sections were then incubated with the primary anti-DYRK1A antibody (Martí et al., 2003) overnight at 4°C at a concentration of 1:500. Subsequently, sections were incubated with biotinylated secondary antimouse antibody at a dilution of 1:200 and then with ABC at a dilution of 1:100 each. Peroxidase activity was visualized with 0.05% diaminobenzidine and 0.01% hydrogen peroxide. No immunoreaction was detected in sections omitting the primary antibody, thus confirming the specificity of the immunoreaction. Samples from control and TgDyrk1a mice were processed in parallel to avoid day to day variations in the immunostaining. Sections were examined using a Nikon Elite E800 microscope.

Neurological assessment (SHIRPA protocol)

SHIRPA primary screen is a comprehensive semiquantitative routine testing protocol to identify and characterize phenotype impairments during which a total of 40 separate measurements are recorded for each animal, including somatometry (Rogers et al., 1997). The SHIRPA primary screen has been used for high throughput analysis in a large-scale mouse mutagenesis project. Full details of the experimental procedures can be found on the web site for the mouse mutagenesis consortium partners: , <http://www.mgc.har.mrc.ac.uk/>. In this study, the protocol was used for analysis of neurological dysfunction. Assessment of each animal began with observation of undisturbed behavior in a cylindrical clear Perspex viewing jar (15-cm height, 11-cm diameter) for wild running or stereotypy. The mice were then transferred to an arena (56 \times 34 cm) for observation of motor behavior and sensorial function. Animals underwent screening exams for visual acuity,

vibrissae, corneal, and pinna responses to an approaching cotton swab, auditory (Preyer reflex), and vestibular function (contact righting reflex and negative geotaxis), grip strength, and body tone. In the last part of the test, changes in excitability, aggression, general fear, vocalization and salivation, and piloerection (for analysis of autonomic function) were recorded. In the touch escape test, the response of the animal to a finger stroke from above was recorded and scored as follows: 0 = no response; 1 = mild (escape response to firm stroke); 2 = moderate (rapid response to light stroke); and 3 = vigorous (escape response to approach). A cohort of 23 mice was tested at 12 months of age and the effect of genotype was evaluated on 21 separate behavioral measurements recorded as part of the SHIRPA primary screen.

Paw print test

To examine the step patterns of the hind limbs during forward locomotion, mice were required to traverse a straight, narrow tunnel. These experiments, designed to evaluate the walking pattern of the mice, were adapted from previously published work (Costa et al., 1999). The hind paws of the mice were coated with black nontoxic waterproof ink. Animals were then placed at one end of a long and narrow tunnel (10 × 10 × 70 cm), which they spontaneously enter and partially or totally transverse. A clean sheet of white paper (35.5 cm long) was placed on the floor of the tunnel to record the paw prints. Footprints made at the beginning and at the end, when the animal was initiating and finishing movement, were excluded from the analysis. The use of a tunnel that was longer than the recording paper has proven to be a necessary measure to avoid artefacts generated by strain differences not directly related to alterations in motor function. This task was repeated at least three times to obtain clear and visible footprints in 20 cm of sheet. Footprint patterns were analyzed for a minimum of five step cycles for each trial. A complete step cycle was defined as the distance from one pair of hind limb prints to the next. Three parameters were registered as follows: (1) stride length, measured as the average distance of forward locomotion between each stride; (2) hind-base width, measured as the average distance between left and right hind footprints; and (3) outward rotation angle, measured in relation to the vertical axis.

Rotating rod test

The performance of mice was tested in the rotarod, a task that evaluates motor coordination and balance. The ability of each mouse to maintain balance on a rotating rod (5 cm diameter and 10 cm long) with a plastic dowel surface was assessed with a commercially available rotarod apparatus (Rotarod LE8500, Panlab SA, Barcelona, Spain). The equipment consisted of a rotating spindle that is able to maintain a fixed rotational speed (FRS) of 7, 10, 14, 19, 24, or 34 rpm and starting at 4 rpm to accelerate at a constant rate to 40 rpm over a 5-min period. The apparatus is provided with magnetic plates to detect when a mouse has fallen off the rod. Mice were placed on the middle of the rotating rod, its body axis being perpendicular to the rotation axis, and its head against the direction of rotation. All animals were tested for acquisitions and maintenance of rotarod performance. The experimental design consisted of two consecutive acquisition trials (Session 1) in which the number of trials required to learn to

remain on the rod at the minimum speed (4 rpm) was recorded. After the mice passed one criterion test, a second session (Day 2) was performed in which two different tasks were performed: (a) motor coordination and balance were assessed by measuring the latency to fall off the rod in consecutive trials with increasing fixed rotational speeds (FRS 7, 10, 14, 19, 24, and 34 rpm), and the animals were allowed to stay on the rod for a maximum period of 5 min per trial and a resting period of 15 min was left between trials; and (b) for the accelerating rod test, the rotation speed was increased during a single session of 1 min from 4 to 40 rpm. For each trial, the elapsed time until the mouse fell off the rod was recorded.

Treadmill performance

The treadmill (Panlab SA) consisted of a belt (50 cm long and 20 cm wide) varying in terms of speed (5 to 150 cm/s) and slope (0°–45°). At the end of the treadmill, an electrified grid was placed on which foot shocks (0.4 mA) were administered whenever the mice felt off the belt. The mice were evaluated for six trials on a single day session (intertrial interval on all trials: 30 min), with a cut-off period of 1 min per trial. The order of presentation of the different belt speeds and inclinations was identical for all mice. In the first two trials, the belt speed was set at 5 cm/s and the inclination at 5°. In the following trials, the inclination was increased from 0° to 20° from the horizontal plane. The mice were placed on the top of the already moving belt facing away from the electrified grid and in the direction opposite to the movement of the belt. Thus to avoid the foot shocks, the mice had to locomote forward. Whenever an animal fell off the belt, foot shocks were applied for a maximal duration of 1 s. After the shocks, the mice were retrieved and placed back on the still moving belt to facilitate the association between safety and the belt.

Grip force recordings

The force exerted by the forelimbs was assessed with an adapted version (Costa et al., 1999) of the procedure (Meyer et al., 1979) to improve the reproducibility of the recordings. A force transducer was used to measure the peak force exerted by a mouse's forelimbs as its grip was broken by the experimenter pulling the mouse by the base of the tail away from the transducer. In the first trial, mice were placed horizontally on the grille, grasping it with the forelimbs, and the experimenter pulling the tail towards himself. In the second trial, the grasping ring was set up vertically instead of horizontally, which caused the animals to grasp more consistently to it. Most of the "human component" of the test was eliminated using a gravity-driven system to produce a consistent 10 N downward force onto the animal's tail. The system was activated manually when the mouse held firmly to the grasping ring of a digital push–pull strain gauge (Grip Strength Meter, Bioseb). The mouse would then fall on a soft cushion about 25 cm below the grasping ring. Each trial was repeated twice.

Swimming test

These experiments were designed to reveal potential motor differences between control and transgenic mice in a water tank. The mice were placed to swim in the central zone of a circular

water-filled tank (120 cm in diameter and 50 cm deep). Water temperature was maintained at $24 \pm 2^\circ\text{C}$ to reduce stress. Mice were allowed to explore the tank for 5 min and monitored with a computer-assisted video tracking system (SMART 3.11, Panlab SA) that directly generated swim path tracks and calculated the swimming speed, swimming distances, and time spent in predetermined zones of the pool. The Wintrack software package (Prof. D Wolfer, Zurich, Switzerland) was applied to the swimming paths obtained to analyze the second-to-second variations in swimming speed and specific parameters revealing the locomotion patterning and potential motor-related differences. The actual version Wintrack 2.4 (Wolfer et al., 2001) operates on paths consisting of time-

stamped XY coordinate pairs, which can be acquired from the tracking system. It allows the selection of 71 predefined parameters, which can be applied to trial blocks, single trials, and time windows within trials. Statistical analysis of the results was performed with SPSS software. After the swimming session, the mice were dried near a heating system. Extended analysis of swimming paths consisted of plotting the second-to-second average values and avoiding regions of the plot where the speed fell below 2 cm/s for more than 2 s (“floating behavior”). The second-to-second variation in swimming speed in the two groups of animals is a valuable way to assess their swimming skill. In addition, we rejected the first and last 5 s of the trial to avoid

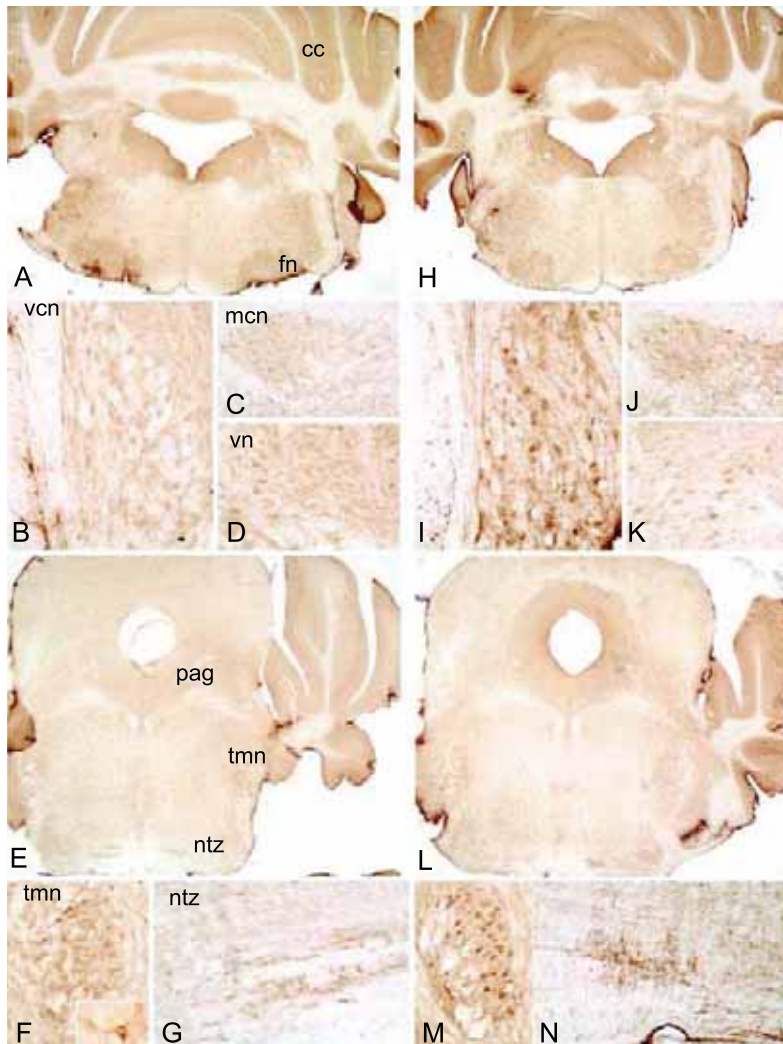


Fig. 1. DYRK1A immunoreactivity in control (A–G) and TgDyrk1a (H–N) mice. DYRK1A immunostaining is shown in the hindbrain (A–D; H–K) and the midbrain (E–G; L–N). In control animals, strong *Dyrk1a* expression is found in the cerebellar cortex and most of the central motor nuclei. Notice a generalized increase in DYRK1A immunoreactivity in TgDyrk1a. Insert in F shows a high magnification of a neuron in the trigeminal motor nucleus, where DYRK1A is concentrated in the soma and proximal neurites. Cc, cerebellar cortex; fn, facial nucleus; mn, medial cerebellar nucleus; ntz, nuclear trapezoid body; pag, periaqueductal grey; tmn, trigeminal motor nucleus; vcn, ventral cochlear nucleus; vn, vestibular nucleus.

artefacts such as those due to individual differences in the initial latency to start swimming.

Statistics

Simple comparisons between TgDyrk1a and control mice in various tasks were performed using the two-tailed unpaired Student *t* test with Welch's or Mann–Withney's correction to account for the different variances in the populations being studied (SPSS 8.0). To assess significant differences in both transgenic lines, a one-way ANOVA with Bonferroni test for post hoc analyses was performed. When no significant differences were detected from transgenic mice of both lines, results were combined. Possible relationships between different measurements were quantified by calculating the Pearson correlation coefficient. Performances on the rotarod were compared using repeated measures ANOVA. Data were expressed as mean \pm SEM. In all tests, a difference was considered to be significant if the obtained probability value was $P < 0.05$.

Results

Dyrk1a expression pattern in TgDyrk1a

DYRK1A expression was strong in several areas of the adult midbrain and hindbrain as previously reported (Martí et al., 2003). Strong *DYRK1A* immunoreactivity was detected in the hindbrain (Figs. 1A–G) mostly in the cerebellar cortex (Fig. 1A) and functionally related structures, including the ventral cochlear nucleus (Fig. 1B) and deep cerebellar nuclei (Figs. 1C and D). Most of the central motor nuclei also display strong *DYRK1A* immunostaining (Figs. 1A, E, and F). Distribution of overexpressed *DYRK1A* was detected in equivalent areas in TgDyrk1a mice with a generalized increase in *DYRK1A* immunoreactivity (Figs. 1H–N) that was especially prominent in the cerebellar cortex.

General evaluation of neurological function

The comprehensive assessment following SHIRPA primary screen did not reveal neurological dysfunctions in TgDyrk1a mice. No differences were detected between TgDyrk1a and the control littermates in the SHIRPA primary screen (Table 1), suggesting no gross impairment in general neural function. The observational assessment of behavior in basal conditions showed no changes in excitability, fear, or aggressive behavior. However, TgDyrk1a presented significant differences in touch escape test, showing a significantly weaker escape reaction ($t = 2.2$, $P < 0.05$; Student's *t* test, Fig. 2).

Gait pattern

The paw print test revealed no significant differences between TgDyrk1a and control mice. TgDyrk1a showed a similar walking pattern than their control littermates over a 20-cm distance, with no significant differences in stride length ($t = 0.311$, $P = 0.8$; Student's *t* test), width ($t = 0.657$, $P = 0.5$), or the number of recorded prints ($t = 0.423$, $P = 0.7$). The patterning of locomotion was assessed measuring the left and right feet outward rotation angle. No differences were detected in the outward rotation angle between

Table 1

SHIRPA primary behavioral assessment, grip strength, and paw print performance in adult TgDyrk1a ($n = 10$) and wild-type mice ($n = 12$)

	Score (mean)	
	Wild type	TgDyrk1A
<i>Sensorial function</i>		
Corneal reflex	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
Toe pinch	1.50 \pm 0.21	1.55 \pm 0.17
Pinna reflex	1.00 \pm 0.00	1.15 \pm 0.17
Visual placing	1.67 \pm 0.14	1.80 \pm 0.13
Reach response	2.25 \pm 0.13	2.20 \pm 0.13
<i>Vestibular function</i>		
Curling reflex	0.00 \pm 0.00	0.05 \pm 0.05
Negative geotaxis	3.00 \pm 0.00	3.00 \pm 0.00
<i>Autonomic function</i>		
Piloerection	0.08 \pm 0.05	1.50 \pm 0.07
Tail elevation	1.21 \pm 0.07	1.25 \pm 0.13
Startle response	1.29 \pm 0.16	1.30 \pm 0.17
Salivation	0.00 \pm 0.00	0.10 \pm 0.01
<i>Neuropsychiatric function</i>		
Fear	0.00 \pm 0.00	0.20 \pm 0.11
Irritability	0.04 \pm 0.04	0.10 \pm 0.06
Aggression	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
<i>Grip strength</i>		
First trial	90.8 \pm 4.10	83.9 \pm 4.12
Second trial	22.4 \pm 2.07	19.3 \pm 1.09
<i>Paw print</i>		
Number of prints	9.46 \pm 0.40	9.24 \pm 0.33
Stride length	3.79 \pm 0.08	3.76 \pm 0.07
Hind-base width	2.71 \pm 0.05	2.65 \pm 0.08
Left foot angle	17.2 \pm 1.11	18.8 \pm 1.71
Right foot angle	19.6 \pm 0.88	21.9 \pm 1.56

Data are expressed as mean \pm SEM.

both genotypes for either the right or the left foot (right foot: $t = 1.304$, $P = 0.209$; left foot: $t = 0.801$, $P = 0.434$).

Rotating rod test

The rotarod test was used as a paradigm that allows the assessment of alterations in different motor-related tasks. Although TgDyrk1a mice could be efficiently trained to maintain balance in the rotarod test, the acquisition of this skill was significantly delayed since TgDyrk1a needed a significantly longer training period than control animals (3.85 vs. 2.15 trials, respectively; $t = 2.6$, $P < 0.05$; Student's *t* test) to learn the task at the minimum rotational speed (Fig. 3A). Moreover, the latency to fall during the first exposure to the rotarod, which is a measure of initial motor skill, was significantly reduced in TgDyrk1a with respect to control mice ($t = 2.46$; $P < 0.05$) (Fig. 3B). No correlation was found between performance in the first trial and activity in either genotype ($r = -0.120$; $P = 0.71$; Pearson's correlation test), indicating that the result obtained was mainly due to impaired motor coordination. Nevertheless, when TgDyrk1a mice were submitted to a more coordination-demanding task, where consecutive trials with increasing rotational speeds were administered, no significant differences were observed on the latency to fall

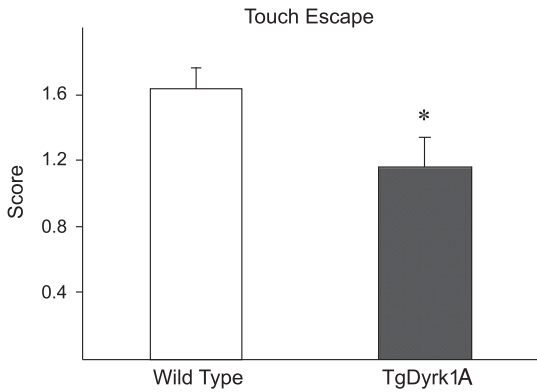


Fig. 2. Touch escape test in wild-type ($n = 12$, open bars) and TgDyrk1a mice ($n = 10$, filled bars). In this test, animals were touched on the back by the experimenter's finger and their behavior was scored as 0 = no response, 1 = escape response to firm stroke, 2 = rapid response to light stroke, and 3 = escape response to approach. TgDyrk1a mice showed a weaker escape response with respect to their control littermates. Data are expressed as means \pm SEM; * $P < 0.05$, Student's t test.

[$F(1,28) = 0.71$; $P = 0.4$; repeated measures ANOVA] (Fig. 3C), indicating that the motor coordination deficit was rapidly overcome by training. Moreover, when mice were submitted to the accelerating rod test, the performances were similar in both groups,

reaching analogous dwell times in the rotating rod ($t = 0.3$; $P = 0.7$; Student's t test).

Treadmill performance

TgDyrk1a performed significantly worse than wild-type mice in the treadmill task (Fig. 4). At 5° slope and minimum speed (pretraining sessions), TgDyrk1a mice received higher number of shocks [$F(1,22) = 4.67$, $P = 0.04$; repeated measures ANOVA] and a longer cumulative period of shock [$F(1,22) = 5.97$, $P = 0.02$; repeated measures ANOVA] with respect to wild-type mice along sessions. Impairment was already present in the training session indicating that the acquisition of the skill was significantly delayed in TgDyrk1a. When mice were submitted to consecutive trials at increasing speed and 20° slope, a task that require a higher coordination capacity, no differences were detected along sessions in wild-type mice, while TgDyrk1a mice presented a higher cumulative duration of shock at different speeds (at 5 cm/s: $P = 0.001$; at 10 cm/s: $P = 0.015$; at 20 cm/s: $P = 0.008$; at 30 cm/s: $P = 0.001$; Mann–Whitney U test). At the highest coordination-demanding task (40 cm/s, 20° slope), no significant differences were detected between both genotypes as showed the cumulated duration of shock ($t = 1.28$, $P = 0.07$; Student's t test). On the other hand, TgDyrk1a mice covered shorter distance than wild-type mice along the sessions of the test [$F(1,22) = 7.32$, $P = 0.02$; repeated measures ANOVA]. These results reveal a severe impairment in motor coordination in TgDyrk1a mice.

Neuromuscular strength

The applied neuromuscular strength of TgDyrk1a mice was analyzed in a horizontal and a vertical plane taking advantage of the gravity force (10 N) to homogenize force conditions and avoid the "human component." No differences were detected in the neuromuscular force applied by transgenic or control animals either when mice were grasping while held by the tail by the

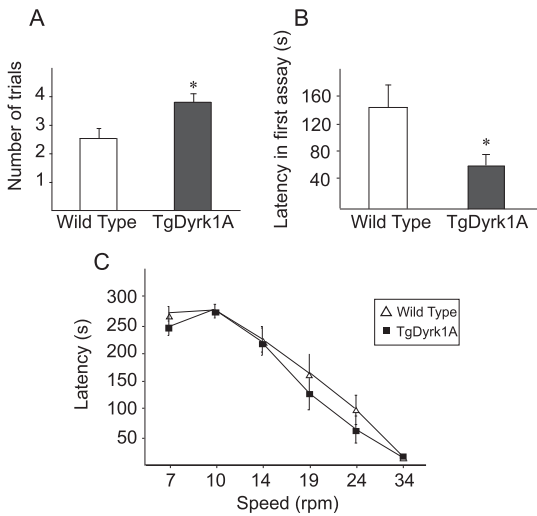


Fig. 3. Performance in the rotarod test of wild-type (open bars, $n = 10$) and TgDyrk1a mice (filled bars, $n = 13$). (A) TgDyrk1a mice showed impairment in motor learning as reflected by the significantly longer training period needed to maintain balance in the rotating rod at the minimum rotational speed (4 rpm); (B) TgDyrk1a showed less dwell time in the rod than control mice during the first exposure. (C) TgDyrk1a mice (filled squares) did not present alterations in motor coordination when submitted to consecutive trials with increasing rotational speeds (7, 10, 14, 24, and 34 rpm). Data are expressed as mean \pm SEM; * $P < 0.05$, Student's t test.

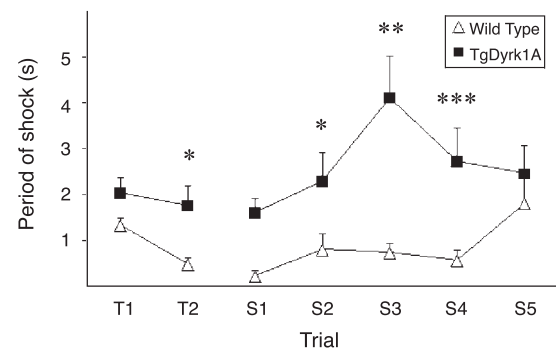


Fig. 4. Performance in the treadmill test of wild-type (filled triangles, $n = 10$) and TgDyrk1a mice (filled squares, $n = 14$). TgDyrk1a showed a delay in the acquisition of the skill reflect by a significant longer cumulative duration of periods of shocks during pretraining sessions at 5° slope (P1 = first session, P2 = second session). TgDyrk1a presented alterations in motor coordination when submitted to consecutive trials with increasing speeds at 20° slope (S1 = 5 cm/s, S2 = 10 cm/s, S3 = 20 cm/s, S4 = 30 cm/s, S5 = 40 cm/s). Data are expressed as mean \pm SEM; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, Mann–Whitney U test.

researcher ($t = 1.187$; $P = 0.2$; Student's t test) or when mice were placed vertically in the grasping grill ($t = 1.339$; $P = 0.2$).

Swimming pattern

Swimming test was designed to reveal potential motor differences between control and transgenic mice in a water tank (Costa et al., 1999). Since our previous work (Altafaj et al., 2001) showed no differences in basal activity but a tendency to hyperactivity in more stressful conditions, the experiment was designed to analyze activity of the mice in an inescapable stressful situation. In this task, average basal motor activity is mainly related to swimming speed but also to a larger proportion of time spent moving. TgDyrk1a and control mice showed similar swimming speeds for the 5-min duration of the test suggesting that both genotypes have a similar tendency to present fatigue in this task. No correlation was found between speed and activity (time spent moving) in either genotype ($r = 0.055$, $P = 0.89$; Pearson's correlation test). TgDyrk1a and their respective control littermates exhibited a similar active time defined as the percentage of time

spent swimming with a linear trajectory ($P = 0.2$ Mann–Whitney U test). On the other hand, TgDyrk1a mice showed increases in nonlinear activity (time spent swimming with a nonlinear trajectory) under these stressful conditions when considering this erratic motor activity. Thus, TgDyrk1a mice performed significantly more number of bursts ($P = 0.02$, Mann–Whitney U test) (Fig. 5A), each presenting a decreased average duration ($P = 0.01$, Mann–Whitney U test) (Fig. 5B) and significantly higher number of stops (periods of inactivity lasting between 1 and 5 s; $P = 0.007$, Mann–Whitney U test) (Fig. 5C). This indicates that TgDyrk1a mice, although being active during a similar period of time, performed more stops and after stopping started to swim faster than controls, thus showing a more disorganized and irregular swimming pattern. Finally, the time of immobility (cumulated duration of periods of inactivity lasting longer than 5 s and separated at least by 1 s of locomotion) in TgDyrk1a mice was decreased with respect to their control littermates, though not significantly ($P = 0.1$, Mann–Whitney U test) (Fig. 5D) because average duration of resting periods was significantly lower in TgDyrk1a mice ($P = 0.02$, Mann–Whitney U test) (Fig. 5E),

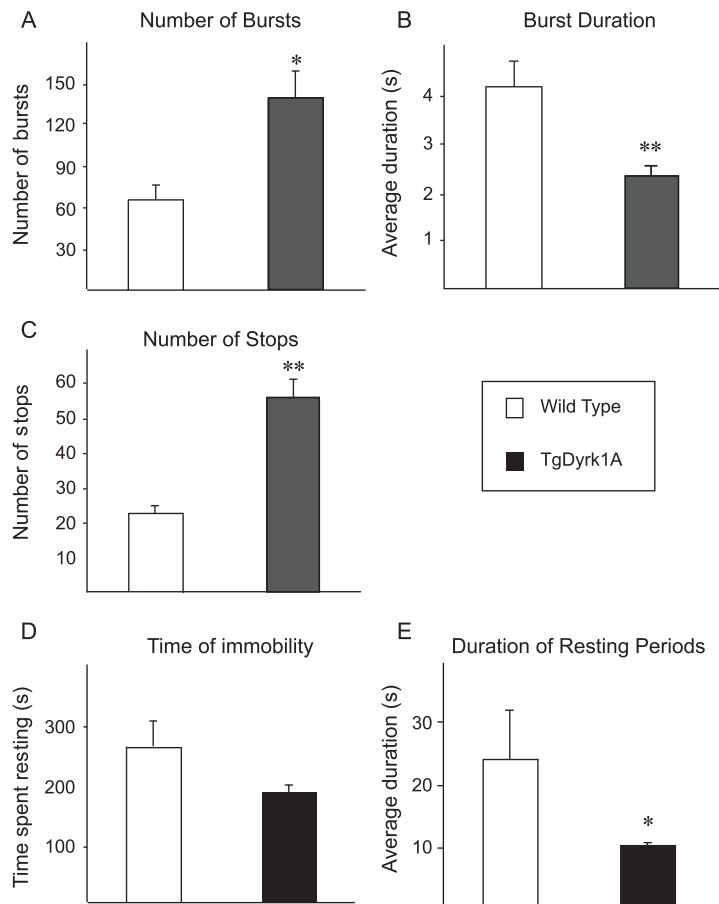


Fig. 5. Swimming pattern of wild-type ($n = 7$, open bars) and TgDyrk1a mice ($n = 9$, filled bars). Number of bursts (A), burst duration (B), and number of stops (C) are shown. TgDyrk1a spent lower immobility time (D), defined as the accumulated duration of periods of inactivity lasting longer than 5 s and separated by 1 s of locomotion (E). Data are mean \pm SEM; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Student's t test.

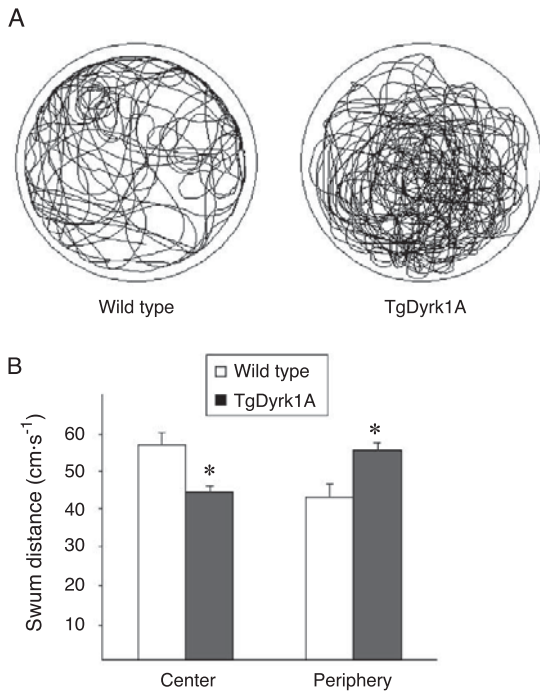


Fig. 6. (A) Representative swim paths of a control and a TgDyrk1a mouse illustrating that TgDyrk1a swam more hazarously and irregularly than control mice. (B) Distance swim in the central and peripheral zones of the water tank. TgDyrk1a mice showed an increase in the distance swum in the center of the water tank demonstrating a reduced thigmotaxis. Data are expressed as mean \pm SEM; * $P < 0.05$, Student's t test.

suggesting differences in behavioral despair in mildly stressful conditions. The latency to visit the center field and the amount of time spent in this zone was not correlated with any measure of locomotor activity and can be interpreted as an indicator of agoraphobia that is reduced in TgDyrk1a mice (Fig. 6A). The extended path analysis in the swimming test experiments can help to differentiate mutation effects on specific anxiety and exploratory behaviors from mere alterations of basal activity. Thigmotaxis is a behavioral strategy commonly observed at early stages of the swimming test that was dramatically reduced in TgDyrk1a mice, as demonstrated by the increase in the distance swum in the center of the water tank with respect to control mice ($t = 0.557$, $P < 0.005$, Student's t test) (Fig. 6B).

Discussion

Several observations have suggested that *DYRK1A* is a good candidate gene to be involved in the motor phenotype of DS, probably related to an aberrant development of the brain. We have identified significant levels of motor dysfunction in TgDyrk1a mice, those tasks involving coordination, motor learning, and organization of motor behavior being more severely affected. In the absence of alterations in gait, spinal reflexes, or the production of grip forces, TgDyrk1a mice showed a significant impairment of

motor learning and mild hyperactivity with a disorganized swimming pattern consistent with abnormal exploratory behavior.

The role of *DYRK1A* in pathways controlling motor function is supported by its expression pattern. *DYRK1A* expression has been described at different development stages and in the adult in mice (Becker et al., 1998; Guimera et al., 1996, 1999; Okui et al., 1999; Song et al., 1996). However, only very recent studies (Martí et al., 2003) have characterized in detail the endogenous distribution of *DYRK1A* protein in the adult nervous system of mice, demonstrating *DYRK1A* expression in areas of the midbrain and hindbrain related to the motor control. The strongest immunoreactivity was detected in the cerebellar cortex and functionally related structures. In the present study, a generalized increase of *DYRK1A* immunoreactivity was detected in TgDyrk1a mice in the areas where *DYRK1A* is found in wild-type mice, indicating that overexpression is affecting structures in which *Dyrk1a* has a physiological role. These data suggest that *DYRK1A* overexpression may have consequences in the motor phenotypes of TgDyrk1a.

Previous work from our laboratory has shown two main motor phenotypes in TgDyrk1a mice: alteration of motor coordination in the coat hanger test and mild hyperactivity in novelty-related situations (Altafaj et al., 2001). These results suggest that motor dysfunction in TgDyrk1a may be related to different levels of functional organization. The motor coordination deficits observed could be related to a cerebellar dysfunction or to disruption of stationary components of movement, such as muscle tone or grasping, whereas hyperactivity may be dependent on functional alteration at the cortical level.

The present work shows that TgDyrk1a mice perform similarly to controls in assessments of forelimb strength, postural skills, balance, gait, and locomotion in basal conditions, thus suggesting the integrity of these components of movement (Clark et al., 1997; Watase et al., 1998). To get further insight in the specific motor coordination abilities and motor learning in TgDyrk1a, we used the rotarod and the treadmill tests. Performance of the rotarod task was affected by overexpression of *Dyrk1a*, but only during the first exposure to the apparatus, as reflected by the significant reduction in the latency to fall off the rod in TgDyrk1a. This impairment in initial motor skill was overcome with repeated training, probably due to the development of compensatory strategies. The coordination deficit previously detected in the coat hanger test in TgDyrk1a was more severe than that observed in the present work (Altafaj et al., 2001). However, it should be borne in mind that the coat hanger test requires the integrity of grasping, and altered grasping adjustment has been demonstrated in the prehensile reflex test in TgDyrk1a, a finding also reported in DS patients (Kearney and Gentile, 2003; Latash et al., 2002). To get further insight in the nature of the motor coordination deficit observed, we used the treadmill paradigm that requires learning a complex sensorimotor task. On the treadmill, large differences in motor coordination emerged in TgDyrk1a. Control mice were far superior to transgenic in the treadmill task. Whereas the control group only slightly reduced their performance across sessions of increasing difficulty, TgDyrk1a mice significantly increased the time and number of shocks received with trials. This lack of improvement indicates impoverished motor function in a test where postural adjustments must be made in response to an external stimulus. Moreover, this result indicates that normal mice were able to maintain their performances before falling by learning a complex sensorimotor skill, walking forward in conjunction with increasing rotation speed.

In the rotarod experiments, cerebellar-mediated motor learning was also significantly compromised as shown by the increase in the number of training sessions necessary to acquisition of the task shown by TgDyrk1a. It has been proposed (Frith and Frith, 1974) that cerebellar dysfunction might be responsible for the motor dysfunction seen in individuals with DS and in the Chromosome 16 partial trisomic mouse model Ts65Dn (Galdzicki and Siarey, 2003). More recent studies, using magnetic resonance imaging (MRI)-based morphometry, have confirmed the finding of smaller than average cerebellar volume in these patients (Aylward et al., 1997; Raz et al., 1995). Ts65Dn mice show smaller cerebellar volumes and a lower number of granule cells (Baxter et al., 2000). However, this could not account for the motor learning deficits observed in TgDyrk1a since the cerebellum is grossly normal with respect to size, cytoarchitecture, and foliation in these mice. DYRK1A is expressed in physiological conditions and overexpressed in TgDyrk1a in Purkinje cells, which provide the major cerebellar output and granule neurons (see Fig. 1). Thus, it might be hypothesized that ultrastructural relationships between both cell types of the cerebellum would be altered by overexpression of *DYRK1A* that could abnormally modulate the function of Purkinje cells in TgDyrk1a with functional consequences in motor learning and coordination.

Additional to the cerebellar dysfunction, other neurological mechanisms have to be considered that may explain the genesis of the complex motor phenotype in DS (Latash and Corcos, 1991; Shumway-Cook and Woollacott, 1985). Hyperactivity can be interpreted as failure of inhibitory control or impulsiveness, suggesting prefrontal cortex deficits, that are present in DS persons, but studies on DS mouse models have not clarified its molecular or structural dependence. Two animal models of DS with segmental trisomy for all (Ts65Dn) or part (Ts1Cje) of human Chromosome 21-homologous region of mouse Chromosome 16 have been reported to present changes in activity levels. Ts65Dn mice are hyperactive, probably because of deficits in inhibiting behavior (Coussons-Read and Crnic, 1996; Escorihuela et al., 1995). On the contrary, Ts1Cje mice have been reported to be hypoactive due to reduced exploratory activity. These results have led the authors infer that genes involved in producing hyperactivity in the Ts65Dn mice could be in the region between *App* and *Sod1* (Sago et al., 2000). However, genes other than those in *App-Sod1* region may affect activity. This might be the case of *Dyrk1a* that has been proposed as an important candidate gene to participate in the physiological control of motor function and to explain hyperactivity in DS but it is localized outside the *App-Sod1* region. TgDyrk1a presented a mild hyperactive phenotype that was only observed in novelty-related situations but not in basal conditions (Altafaj et al., 2001). Conversely, in YAC transgenic mice containing *Dyrk1a*, overexpression of this gene has been related to normal levels of activity or even slight hypoactivity (Smith et al., 1997). Finally, involvement of DYRK1A in the physiological control of movement is supported by the fact that reduction of *Dyrk1a* expression in heterozygous *Dyrk1a* mice leads to a clear hypoactivity (Fotaki et al., 2002).

Besides the level of activity, the organization of motor behavior is also importantly altered in DS. In the present experiments, swimming test was designed to reveal potential differences in the pattern of motor activity between control and transgenic mice in a water tank. Commonly used parameters of locomotor activity are influenced both by changes of speed and

by alterations of the temporal patterning of locomotion. In the present experiments, swimming speeds were similar for the 10-min duration of the test, suggesting that TgDyrk1a mice presented no gross motor alterations that could interfere with the performance of the task. In general terms, TgDyrk1a mice exhibited a tendency to present longer active time with respect to control littermates, although the levels of hyperactivity were mild and only related to the nonlinear activity. It should be borne in mind that there is an age effect in DS-associated hyperactivity so that hyperactivity is only present in rather few individuals at about 3–5 years of age, while the animals used in the present studies were quite old (12–14 months). Thus, hyperactivity should more likely be considered as an index of cortical dysfunction that would be a sign of impulsivity or poor behavioral inhibition. This is also supported by the fact that the pattern of activity was qualitatively different in TgDyrk1a mice that presented a more disorganized and irregular swimming pattern.

Our previous work (Altafaj et al., 2001) showed that hyperactivity was related to anxiety-dependent behaviors since it was only detected in stressful or novelty-related experimental situations. Confrontation of mice with novel objects or environments elicits fear and avoidance responses on the one hand and approach and exploratory behavior on the other (Coussons-Read and Crnic, 1996; Holtzman et al., 1996; Hyde and Crnic, 2001, 2002; Hyde et al., 2001a,b; Reeves et al., 1995). Monitoring behavior in such a conflict situation is often used to assess levels of anxiety. However, the objective parameters measured depend on locomotion and are therefore potentially biased by changes of basal motor activity. The extended path analysis in swimming test experiments can help to differentiate mutation effects on specific anxiety and exploratory behaviors from mere alterations of basal activity. As an indicator of the level of anxiety, we analyzed the amount of time spent in the center and the amount of hesitation displayed while entering it. Control mice showed decreasing levels of activity during the whole test period along with an increased tendency to remain in the margins of the pool, whereas TgDyrk1a paths were characterized by increased exploration into the center of the pool along sessions, thus suggesting decreased anxiety-related behavior in TgDyrk1a. The issue of whether increased levels of exploration into the center of the pool is due to decreased anxiety remains a matter of interpretation, and may be an aversion to open spaces is a learned response that the TgDyrk1a mice have neither assimilated nor remembered. Similar results were obtained previously in Ts65Dn mice (Coussons-Read and Crnic, 1996) where a tendency to an impulsive behavior was observed in the plus-maze. However, the time of immobility (cumulated duration of periods of inactivity lasting longer than 5 s and separated at least by 1 s of locomotion) in TgDyrk1a mice was decreased with respect to their control littermates because average duration of resting periods was significant lower in transgenic mice, suggesting differences in behavioral despair in stressful conditions.

The data presented here suggest that *DYRK1A* is a candidate gene to explain the some of DS-associated phenotypes. We report effects of *Dyrk1a* overexpression on different levels of motor function related to the expression pattern of the gene. Previous studies have found motor alterations in other mouse models for DS that are similar to those found in the present study. In fact the value of this study lies on the finding of the possible genetic dependence of the phenotypes observed in trisomic animals bearing in trisomy the cluster of genes present in the distal part of Chromosome 16.

Acknowledgments

This work was supported by Spanish Ministry of Science (SAF2001-1231, SAF2002-00799), European Union (QLG1-CT-2002-00816), Fundación CIEN, and Foundation Jérôme Lejeune. MML is recipient of a MICYT fellowship.

References

- Altajaf, 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 mouse model of Down's syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1915–1923.
- Aylward, E.H., Habbak, R., Warren, A.C., Pulsifer, M.B., Barta, P.E., Jeram, M., Pearson, G.D., 1997. Cerebellar volume in adults with Down syndrome. *Arch. Neurol.* 54, 209–212.
- 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. *Hum. Mol. Genet.* 9, 195–202.
- Becker, W., Weber, Y., Wetzel, K., Eimbrter, K., Tejedor, F.J., Joost, H.G., 2000. Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J. Biol. Chem.* 273, 25893–25902.
- Clark, H.B., Burrell, E.N., Yunis, W.S., Larson, S., Wilcox, C., Hartman, B., Matilla, A., Zoghbi, H.Y., Orr, H.T., 1997. Purkinje cell expression of a mutant allele of *SCA1* in transgenic mice leads to disparate effects on motor behaviors, followed by a progressive cerebellar dysfunction and histological alterations. *J. Neurosci.* 17, 7385–7395.
- Cole, K.J., Abbs, J.H., Turner, G.S., 1988. Deficits in the production of grip forces in Down syndrome. *Dev. Med. Child Neurol.* 30, 752–758.
- Costa, A.C., Walsh, K., Davison, M.T., 1999. Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome. *Physiol. Behav.* 68, 211–220.
- Coussons-Read, M.E., Cmic, L.S., 1996. Behavioral assessment of the Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome: altered behavior in the elevated plus maze and open field. *Behav. Genet.* 26, 7–13.
- Davis, W., Kelso, J.A.S., 1982. Analysis of “invariant characteristics” in motor control of Down's syndrome and normal subjects. *J. Mot. Behav.* 14, 192–214.
- Dierssen, M., 2003. Special interest section—Down's syndrome: postgenomic approaches to neurobiological problems. *Genes Brain Behav.* 2, 152–155.
- Escorihuela, R.M., Fernandez-Teruel, A., Vallina, I.F., Baamonde, C., Lumberras, M.A., Dierssen, M., Tobeña, A., Florez, J., 1995. A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neurosci. Lett.* 199, 143–146.
- 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.
- Frith, U., Frith, C.D., 1974. Specific motor disabilities in Down's syndrome. *J. Child Psychol. Psychiatry* 15, 293–301.
- Galdzicki, Z., Siarey, R.J., 2003. Understanding mental retardation in Down's syndrome using trisomy 16 mouse models. *Genes Brain Behav.* 2, 167–178.
- Gemus, M., Palisano, R., Russell, D., Rosenbaum, P., Walter, S.D., Galuppi, B., Lane, M., 2001. Using the gross motor function measure to evaluate motor development in children with Down syndrome. *Phys. Occup. Ther. Pediatr.* 21, 69–79.
- Guimera, 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. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1305–1310.
- Guimera, J., Casas, C., Estivill, X., Pritchard, M., 1999. Human minibrain homologue (*MNBH/DYRK1*): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics* 57, 407–418.
- Haslam, R.H.A., 1995. Neurological problems associated with Down syndrome. In: Nadel, L., Rosenthal, D.A. (Eds.), *Down Syndrome: Living and Learning in the Community*. Wiley, New York, pp. 107–114.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 13333–13338.
- Hyde, L.A., Cmic, L.S., 2001. Age-related deficits in context discrimination learning in Ts65Dn mice that model Down syndrome and Alzheimer's disease. *Behav. Neurosci.* 115, 1239–1246.
- Hyde, L.A., Cmic, L.S., 2002. Reactivity to object and spatial novelty is normal in older Ts65Dn mice that model Down syndrome and Alzheimer's disease. *Brain Res.* 945, 26–30.
- Hyde, L.A., Cmic, L.S., Pollock, A., Bickford, P.C., 2001a. Motor learning in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Dev. Psychobiol.* 38, 33–45.
- Hyde, L.A., Frisone, D.F., Cmic, L.S., 2001b. Ts65Dn mice, a model for Down syndrome, have deficits in context discrimination learning suggesting impaired hippocampal function. *Behav. Brain Res.* 118, 53–60.
- Kearney, K., Gentile, A.M., 2003. Prehension in young children with Down syndrome. *Acta Psychol. (Amst.)* 112, 3–16.
- Latash, M.L., Corcos, D.M., 1991. Kinematic and electromyographic characteristics of single-joint movements of individuals with Down syndrome. *Am. J. Ment. Retard.* 96, 189–201.
- Latash, M.L., Kang, N., Patterson, D., 2002. Finger coordination in persons with Down syndrome: atypical patterns of coordination and the effects of practice. *Exp. Brain Res.* 146, 345–355.
- Martí, E., Altajaf, X., Dierssen, M., De la Luna, S., Fotaki, V., Alvarez, M., Pérez-Riba, M., Ferrer, I., Estivill, X., 2003. *Dyrk1a* expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system. *Brain Res.* 964, 250–263.
- Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C., Riley, M.T., 1979. A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1, 233–236.
- Morris, A.F., Vaughan, S.E., Vaccaro, P., 1982. Measurements of neuromuscular tone and strength in Down's syndrome children. *J. Ment. Defic. Res.* 26, 41–46.
- Nadel, L., 2003. Down's syndrome: a genetic disorder in biobehavioral perspective. *Genes Brain Behav.* 2, 156–166.
- 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.
- Palisano, R.J., Walter, S.D., Russell, D.J., Rosenbaum, P.L., Gemus, M., Galuppi, B.E., Cunningham, L., 2001. Gross motor function of children with down syndrome: creation of motor growth curves. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 82, 494–500.
- Pritchard, M.A., Kola, I., 1999. The “gene dosage effect” hypothesis versus the “amplified developmental instability” hypothesis in Down syndrome. *J. Neural. Transm., Suppl.* 57, 293–303.
- Raz, N., Torres, I.J., Briggs, S.D., Spencer, W.D., Thornton, A.E., Loken, W.J., Gunning, F.M., McQuain, J.D., Driesen, N.R., Acker, J.D., 1995. Selective neuroanatomic abnormalities in Down's syndrome and their cognitive correlates: evidence from MRI morphometry. *Neurology* 45, 356–366.
- Reeves, R.H., Irving, N.G., Moran, T.H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S.S., Schmidt, C., Bronson, R.T., Davison, M.T., 1995. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat. Genet.* 11, 177–184.

- Robertson Ringenbach, S.D., Chua, R., Maraj, B.K., Kao, J.C., Weeks, D.J., 2002. Bimanual coordination dynamics in adults with Down syndrome. *Motor Control* 6, 388–407.
- Rogers, D.C., Fisher, E.M., Brown, S.D., Peters, J., Hunter, A.J., Martin, J.E., 1997. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm. Genome* 8, 711–713.
- 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.
- Shumway-Cook, A., Woollacott, M.H., 1985. Dynamics of postural control in the child with Down syndrome. *Phys. Ther.* 65, 1315–1322.
- 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.
- Song, W.J., Sternberg, L.R., Kasten-Sportes, C., Keuren, M.L., Chung, S.H., Slack, A.C., Miller, D.E., Glover, T.W., Chiang, P.W., Lou, L., Kurnit, D.M., 1996. Isolation of human and mouse homologues of the *Drosophila* minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome “critical region”. *Genomics* 38, 331–339.
- Spano, M., Mercuri, E., Rando, T., Panto, T., Gagliano, A., Henderson, S., Guzzetta, F., 1999. Motor and perceptual-motor competence in children with Down syndrome: variation in performance with age. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 3, 7–13.
- 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.
- Watase, K., Hashimoto, K., Kano, M., Yamada, K., Watanabe, M., Inoue, Y., Okuyama, S., Sakagawa, T., Ogawa, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K., Tanaka, K., 1998. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 10, 976–988.
- Wolfer, D.P., Madani, R., Valenti, P., Lipp, H.P., 2001. Extended analysis of path data from mutant mice using the public domain software Wintrack. *Physiol. Behav.* 73, 745–753.

Haploinsufficiency of *Dyrk1A* in Mice Leads to Specific Alterations in the Development and Regulation of Motor Activity

V. Fotaki and M. Martínez de Lagrán
Genomic Regulation Center

X. Estivill
Genomic Regulation Center and Pompeu Fabra University

M. Arbonés and M. Dierssen
Genomic Regulation Center

DYRK1A is a protein kinase proposed to be involved in neurogenesis. Gene-targeting disruption of *Dyrk1A* in mice leads to decreased body and brain size, with no severe disturbance of behavior. In this study, the authors focused on the motor profile of *Dyrk1A*^{+/-} mice. These mice presented impairment of neuromotor development with decreased activity, suggesting a physiological role of *Dyrk1A* in the maturation of the neuromotor system. In the adult, a marked hypoactivity and alteration of specific motor parameters were detected. These results are in agreement with the significant expression of *Dyrk1A* in structures related to motor function and support a role of *Dyrk1A* in the control of motor function.

DYRK1A is a protein kinase that has been identified in vertebrates, including humans (Guimera et al., 1996; Shindoh et al., 1996), rats (Kentrup et al., 1996), mice (Song et al., 1996), and chickens (Hammerle et al., 2002), and in the invertebrates *Drosophila melanogaster* (Tejedor et al., 1995) and, most recently, *Caenorhabditis elegans* (Raich et al., 2003). Although the reports about the in vitro biochemical partners and properties of DYRK1A are increasing rapidly (Alvarez, Estivill, & de la Luna, 2003; Becker & Joost, 1999; Campbell & Proud, 2002; Himpel et al., 2000, 2001; Wiechmann et al., 2003), little is known about the signal transduction pathway (or pathways) and the biological function of this kinase. The high levels of expression of DYRK1A orthologues in the adult (Guimera et al., 1996; Marti et al., 2003)

and developing nervous system (Hammerle et al., 2002; Okui et al., 1999; Song et al., 1996) indicate an important role of this protein in the development and function of this system. In particular, a detailed study of the immunohistochemical pattern of the mouse orthologue in the adult brain has shown that *Dyrk1A* is widely expressed throughout the neuropil, with expression being abundant in areas of the midbrain and hindbrain related to motor control, especially in the cerebellar cortex and functionally related structures (Marti et al., 2003).

Initial evidence supporting the involvement of DYRK1A in nervous system development came from flies mutant for the *Drosophila Dyrk1A* homologue, *minibrain (mnb)*. *mnb* flies exhibit a decrease in the size of central brain hemispheres and optic lobes that seems to result from abnormal neuroblast spacing in the outer proliferation centers of larval brains, implicating *mnb* in postembryonic neurogenesis. In addition, these flies present abnormal behavior in tests that evaluate locomotor activity, visual acuity, and olfactory learning (Tejedor et al., 1995). In humans, *Dyrk1A* maps to Chromosome 21, and its overexpression is believed to cause some of the neurological abnormalities observed in Down syndrome patients, including the cognitive deficits (Guimera, Casas, Estivill, & Pritchard, 1999; Guimera et al., 1996). This assumption is supported by the phenotype observed in transgenic mouse models overexpressing *Dyrk1A*, the TgYAC157Ftel (Smith et al., 1997) and the TgDyrk1A (Altafaj et al., 2001). Overexpression of *Dyrk1A* in these models leads to a specific delay in the acquisition of mature locomotor activity, whereas adult mice exhibit hyperactive behavior (Altafaj et al., 2001), impairment of motor learning, and alteration of the organization of locomotor behavior (Martínez de Lagrán et al., 2004). Defects in the processing of sensory information are also observed in *C. elegans* overexpressing the homologous *Dyrk1A* gene, termed *mbk-1* (Raich et al., 2003).

We have previously reported the generation of a knockout mouse model with null levels of DYRK1A protein expression

V. Fotaki, M. Martínez de Lagrán, M. Arbonés, and M. Dierssen, Genes and Disease Program, Genomic Regulation Center, Barcelona, Spain; X. Estivill, Genes and Disease Program, Genomic Regulation Center, and Life Sciences and Health Department, Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain.

V. Fotaki is now at the Division of Biomedical Sciences, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom.

This work was supported by European Commission Grant QLG1-CT-2002-00816 to X. Estivill, La Fundació la Marató de TV3 Grants 01-4230 to M. Arbonés and 01-3710 to M. Dierssen, and grants from the Lejeune Foundation and the Fundación Centro de Investigación en Red sobre Enfermedades Neurológicas to M. Dierssen. V. Fotaki was supported by a Training and Mobility of Researchers Marie Curie Research Training Grant, and M. Martínez de Lagrán was supported by Ministerio de Ciencia y Tecnología Fellowship SAF 1999-0092-C02-01. We are grateful to D. Solanes and coworkers of the Cancer Research Institute animal facility for expert care of the mice.

Correspondence concerning this article should be addressed to M. Dierssen, Genes and Disease Program, Genomic Regulation Center, Pas-seig Marítim 37-49, 08003 Barcelona, Spain. E-mail: mara.dierssen@crq.es

(*Dyrk1A*^{-/-}; Fotaki et al., 2002). These mice die during midgestation, indicating an essential role of *DYRK1A* in embryonic development. Mice heterozygous for the mutation (*Dyrk1A*^{+/-}) present reduced viability and significant reduction in body size from birth to adulthood. In addition, although the general cytoarchitecture and the neural populations are maintained in *Dyrk1A*^{+/-} brains, these mice exhibit a disproportionate decrease in the size of midbrain and hindbrain regions. *Dyrk1A*^{+/-} mice show a delay in neurodevelopment, and adults exhibit normal general behavior, except for enhanced freezing and poorer reaction in the startle response (Fotaki et al., 2002). The purpose of the present report was to examine the motor behavior of *Dyrk1A*^{+/-} mice by using a series of tests that evaluate neuromotor skills in preweaning and adult mice. We detected specific motor deficits and poorer performance in some motor tasks. The results are discussed in relation to the functional implication of *DYRK1A*.

Method

Subjects

Mice heterozygous for a *Dyrk1A* null mutation (*Dyrk1A*^{-/-}) and control littermates generated by crossings between *Dyrk1A*^{+/+} females and *Dyrk1A*^{+/-} males in a C57BL/6-129/Ola mixed genetic background were used. Mice were genotyped as previously described (Fotaki et al., 2002). In brief, mice were genotyped by polymerase chain reaction (PCR) analysis of tail genomic DNA. We conducted PCR reactions as previously described (Fotaki et al., 2002), using the following combination of primers: neoT (5'-ATTCCGAGCGCATCGCTTCTATCGCC-3'); *Dyrk1A*-P1 (5'-CT-TATGACAGAGTGGAGCAA-3'), and *Dyrk1A*-P2 (5'-CGTGATGAG-CCCTTACCTATG-3'). Mice from the same litter and sex were housed in the same cage and maintained in standard environmental conditions of temperature (21 ± 2 °C), in a 12-hr light-dark (LD) cycle (lights on at 0600) with ad-lib access to food and water. For the sake of consistency, each experiment was conducted by the same experimenter in the same isolated room and at the same time of day. A period of 1 week elapsed between each series of experiments. For the preweaning studies, both male and female pups were analyzed. In the experiments in adult mice, each experimental group consisted of a minimum of 7 adult male mice (5–7 months old) of the same genotype. All experimental protocols involving the use of mice were performed in accordance with recommendations for the proper care and use of laboratory animals and approved by the local ethics committee.

Preweaning Motor Behavior

Neuromotor development was assessed on Postnatal Days 7, 10, and 14 (P7, P10, and P14) in *Dyrk1A*^{+/+} ($n = 25$) and *Dyrk1A*^{+/-} ($n = 11$) mice from eight different litters. We used the pivoting and walking as well as the climbing and wire suspension tests to analyze craniocaudal neuromotor maturation. Pivoting locomotion was evaluated on a flat surface covered with a green paper, on which lines had been drawn to delineate four 90° quadrants. The pivoting displacement of the pups was evaluated as the total number of degrees in a completed 90° segment, during 60 s. In the walking test, the latency of the mouse to lift up on all four legs and walk a distance exceeding its body length was recorded. The climbing capacity of pups was measured on a vertical grid (15 cm high). Scores ranged from 0 (when the mouse fell off the grid) to 10 (when the mouse reached the top of the grid). In the wire suspension test, mice were placed with their forelimbs on a thin wooden stick (2 mm) elevated 40 cm above the floor. Latency to fall and number of displacements (number of equal segments crossed) along the stick were recorded. In addition, traction capacity was scored as 1 if mice used one forelimb to hang from the stick, 2 if they used both forelimbs, 3

if they lifted up one hind limb, and 4 if they used all four limbs to hang from the stick.

Paw-Print Test

This experiment, designed to evaluate the walking pattern of the adult mice, was adapted from previously published work (Barlow et al., 1996). The hind paws of the mice were coated with black nontoxic waterproof ink. Mice were then placed at one end of a long, narrow tunnel (10 cm high × 10 cm wide × 70 cm long), which they spontaneously entered and partially or totally transversed. A clean sheet of white paper (35.5 cm long) was placed on the floor of the tunnel to record the paw prints. Footprints made at the beginning and at the end, when the mouse was initiating and finishing movement, were excluded from the analysis. The use of a tunnel that was longer than the recording paper has proven to be a necessary measure to avoid artifacts generated by strain differences not directly related to alterations in motor function. This task was repeated at least three times in order to obtain clearly visible footprints in 20 cm of the sheet. Footprint patterns were analyzed for a minimum of five step cycles for each trial. A complete step cycle was defined as the distance from one pair of hind-limb prints to the next. Three parameters were registered: (a) stride length, measured as the average distance of forward locomotion between each stride; (b) hind-base width, measured as the average distance between left and right hind footprints; and (c) outward rotation angle, measured in relation to the vertical axis.

Open Field Test

Spontaneous activity of adult mice in a novel environment was evaluated in an open field. The open field was a square white Plexiglas box (70 cm long × 70 cm wide × 25 cm high) divided into 25 equal squares. Each mouse was placed in the center of the apparatus, and mean speed, number of squares crossed with four paws, distance traveled (in the center and the periphery), rearing activity, grooming behavior, and defecations (number of fecal boli) were scored during 5 min. The path of each mouse was registered with a video camera connected to a video tracking system (SMART 3.11, PANLAB, S.A., Barcelona, Spain). The test was conducted during the light phase of the LD cycle (50 lux), and the Plexiglas box was cleaned with ethanol after each trial to eliminate odors of previously tested mice.

Balance and Motor Coordination of Adult Mice

Stationary beam. The capacity of mice to balance was evaluated in a square static beam (50 cm long and 12 mm wide), elevated 40 cm, during a period of 20 s. The mouse received a score of 0 if it fell before the 20-s period, 1 if it remained in the center of the bar, 2 if it moved out of the center but did not reach the ends, and 3 if it reached one of the ends.

Coat hanger. The coat-hanger test was used to evaluate forelimb prehensile reflex, traction capacity, and motor coordination. The forelimb prehensile reflex was evaluated and was scored as 0 if the mouse fell off the hanger and 1 if it remained on the wire during a 5-s period. Traction capacity was scored as 0 if the mouse did not lift its hind limbs, 1 if it lifted one hind limb, 2 if it lifted both, and 3 if it reached one of the ends of the coat hanger. After this initial evaluation, mice were placed in the middle of the wire in an upside-down position. The latency before falling, time to reach one of the ends of the hanger, and the activity performed on the wire were measured in one trial over 60 s.

Rotarod test. Motor coordination and balance were further tested on a rotarod. The ability of each mouse to maintain balance on a rotating plastic rod (5 cm diameter and 10 cm long) was assessed with a commercially available rotarod apparatus (Rota-rod LE8500; PANLAB SA, Barcelona, Spain). The equipment consisted of a rotating spindle that is able to maintain a fixed rotational speed (FRS) and, starting at 4 rpm, to accelerate

at a constant rate to 40 rpm over a 5-min period. The apparatus is provided with magnetic plates to detect when a mouse falls off the rod. Each mouse was placed in the middle of the rotating rod with its body axis perpendicular to the rotation axis and its head directed against the direction of rotation. The dwell time on the rod was measured. The experimental design consisted of two consecutive trials. During the first session (Day 1), mice were trained to learn to walk on the rotarod, and the number of trials required to learn to remain on the rod for a minimum of 3 min at the minimum speed (4 rpm) was recorded. After the mice passed one criterion test, a second session (Day 2) that included two different tasks was performed. In the first trial, motor coordination and balance were assessed by measuring the latency to fall off the rod in six consecutive trials at increasing rotational speeds (FRS 4, 7, 10, 14, 24, and 34 rpm). The mice were allowed to stay on the rod for a maximum of 5 min per trial, and were allowed a resting period of 15 min between trials. For the second trial (accelerating rod test), the rotation speed was increased from 4 to 40 rpm during a single session of 1 min. For each trial, the elapsed time until the mouse fell off the rod was recorded.

Grip-Force Recordings

The force exerted by the forelimbs was assessed with an adapted version (Costa, Walsh & Davisson, 1999) of the original procedure (Meyer, Tilson, Byrd, & Riley, 1979) to improve the reproducibility of the recordings. A force transducer was used to measure the peak force exerted by the forelimbs of the mouse as its grip was broken by the experimenter pulling the mouse away from the transducer by the base of the tail. In the first trial, a mouse was placed horizontally on the grille, grasping it with its forelimbs, and the experimenter pulled the mouse's tail toward him. In the second trial, the grasping ring was set up vertically instead of horizontally, which caused the mouse to grasp more consistently to it. Most of the "human component" of the test was eliminated by using a gravity-driven system to produce a consistent 10 N downward force onto the mouse's tail. The system was activated manually when the mouse held firmly to the grasping ring of a digital push-pull strain gauge (Grip Strength Meter; BIOSEB, Chaville, France). The mouse would then fall on a soft cushion about 25 cm below the grasping ring. Each trial was repeated twice, and the data were given as the mean (\pm SEM) of both values.

Data Analysis

Parametric data are reported as means (\pm SEM), and nonparametric data are reported as medians (\pm semi-interquartile range). When no differences between sexes were detected by two-way analysis of variance (ANOVA), the data were collapsed across sex. Simple comparisons between *Dyrk1A*^{+/-} and control mice in various tasks were performed with one-way ANOVA to account for the different variances in the populations studied. Performances on the rotarod were compared by means of repeated measures ANOVA. Nonparametric data were analyzed with the Mann-Whitney *U* test. Possible relationships between different measurements were quantified by calculating the Pearson correlation coefficient. Significance levels were set at $p < .05$. The statistical analysis was performed with SPSS software (SPSS for Windows, Version 8.0; SPSS, Chicago, IL).

Results

Neuromotor Development of *Dyrk1A*^{+/-} Mice

Two-way ANOVA found no significant effect of sex for any behavioral measure, and therefore, data were collapsed across sex.

Pivoting activity and acquisition of gait were assessed at P7, P10, and P14. The pivoting activity of *Dyrk1A*^{+/-} mice and control mice changed along sessions in a significant manner, as revealed by repeated measures ANOVA, $F(2, 58) = 10.527$, $p < .01$, with

no interaction between session and genotype, $F(1, 58) = 0.283$, $p = .75$. One-way ANOVA on Session 1 (P7) revealed a significant reduction in the number of pivots performed by *Dyrk1A*^{+/-} compared with controls, $F(1, 36) = 3.981$, $p < .05$ (see Figure 1A). In the walking test, latency was significantly reduced along sessions, $F(2, 56) = 9.236$, $p < .01$, with no Genotype \times Session interaction (Figure 1B). The climbing activity, assessed at P10 and P14, showed a significant session effect, $F(1, 35) = 77.949$, $p < .01$, and genotype effect, $F(1, 35) = 259.138$, $p < .01$. Subsequent one-way ANOVA revealed lower climbing activity in *Dyrk1A*^{+/-} mice at P10, $F(1, 36) = 3.839$, $p = .06$, and a significant difference at P14, $F(1, 36) = 14.916$, $p < .01$ (Figure 1C). On the wire suspension test at P10, *Dyrk1A*^{+/-} mice presented no differences with wild-type mice in the latency to fall or the traction capacity. Similarly, at P14, even though both latency to fall and traction scores were lower in *Dyrk1A*^{+/-} mice, the effects did not reach statistical significance (Figures 1D and 1E). Similarly, no differences were observed in the number of displacements in *Dyrk1A*^{+/-} mice (Figure 1F).

Paw-Print Test

The walking pattern was examined in *Dyrk1A*^{+/-} adult male mice by means of the paw-print test. *Dyrk1A*^{+/-} mice showed a significant increase in the number of steps over a 20-cm distance: one-way ANOVA, $F(1, 13) = 13.089$, $p < .01$ (Figure 2A), with

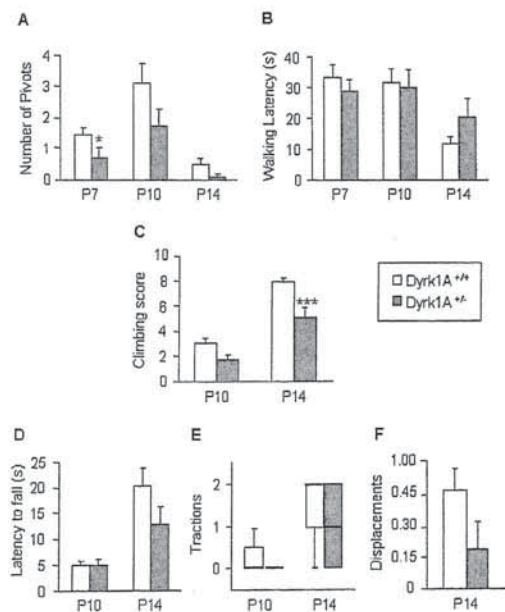


Figure 1. Neuromotor development. A: Pivoting activity; B: walking activity; C: climbing activity; and (D-F) wire suspension test. D: latency to fall from the wire; E: number of tractions; and F: number of displacements. Data are means (\pm SEM). In Panel E, data are medians (\pm interquartile range). *Dyrk1A*^{+/+}, $n = 25$; *Dyrk1A*^{+/-}, $n = 11$. P = postnatal day. * $p < .05$, *** $p < .001$.

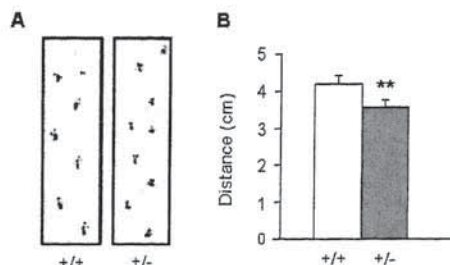


Figure 2. Paw-print test. A: Paw prints of *Dyrk1A*^{+/+} and *Dyrk1A*^{+/-} adult male mice over a distance of 20 cm. The number of prints of mutant mice is significantly increased compared with controls. B: Mean (\pm SEM) distance between each step. *Dyrk1A*^{+/+}, $n = 7$; *Dyrk1A*^{+/-}, $n = 7$. ** $p < .01$.

a subsequent decrease in the stride length, $F(1, 13) = 9.087$, $p < .01$ (Figure 2B), but not in the width of the step, $F(1, 13) = 0.329$, $p = .58$. The pattern of locomotion was assessed by measuring the outward rotation angle, but no differences were detected between genotypes, $F(1, 13) = 0.254$, $p = .62$. No correlation was observed between body weight and number of steps.

Behavior in the Open Field

The activity of adult male mice was further evaluated in the open field during the light phase of the LD cycle (0600–0900). Different parameters evaluated in this task revealed hypoactive behavior for *Dyrk1A*^{+/-} mice. The mean speed of *Dyrk1A*^{+/-} mice was significantly lower as compared with controls, $F(1, 15) = 54.342$, $p < .01$ (see Figure 3A). As a consequence, *Dyrk1A*^{+/-} mice traveled a shorter distance than controls during the 5-min session, $F(1, 15) = 43.741$, $p < .01$ (Figure 3B). In addition, they presented a significant decrease in the number of central, $F(1, 15) = 46.725$, $p < .01$, and peripheral, $F(1, 15) = 55.242$, $p < .01$ (Figure 3C) square crossings. Rearing activity was also significantly reduced in *Dyrk1A*^{+/-} mice, $F(1, 15) = 57.653$, $p < .01$. In contrast, no differences were observed in the number of grooming activities and defecations (Figure 3D).

General Balance and Motor Coordination

Stationary beam test and coat-hanger test. In the stationary beam test, *Dyrk1A*^{+/-} mice reached a score similar to that of wild-type littermates ($p = .93$, Mann–Whitney U test). In the coat-hanger test, *Dyrk1A*^{+/-} mice scored similar to controls for the prehensile reflex and traction capacity (see Figure 4A). However, *Dyrk1A*^{+/-} mice presented a significantly lower latency to fall compared with controls: one-way ANOVA, $F(1, 34) = 8.210$, $p < .01$. A nonsignificant tendency toward a decrease was found in the time to arrive at the end of the hanger, $F(1, 34) = 0.522$, $p = .48$ (Figure 4B), as well as the number of crossings along the wire.

Locomotor behavior in the rotarod task. During the first day of the task, assessment of motor learning at the minimum rotational speed (4 rpm) was similar in control and *Dyrk1A*^{+/-} mice. We did not observe interaction between trial and genotype: MANOVA, $F(1, 37) = 0.303$, $p = .59$, nor any significant differ-

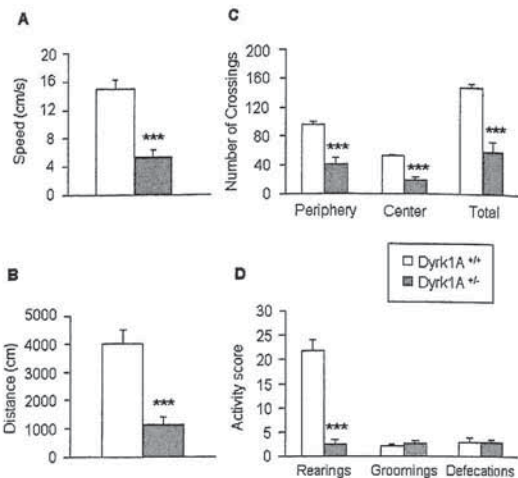


Figure 3. Behavioral analysis of adult male mice in the open field. A: Mean walking speed. B: Total distance traveled. C: Number of peripheral, central, and total square crossings. D: Number of rearings, groomings, and defecations. Data are means (\pm SEM). *Dyrk1A*^{+/+}, $n = 7$; *Dyrk1A*^{+/-}, $n = 7$. *** $p < .001$.

ence in the number of trials necessary to learn the task. Both *Dyrk1A*^{+/-} mice and their control counterparts reached asymptotic motor learning during the fifth trial of the task. During the second session (Day 2), *Dyrk1A*^{+/-} mice exhibited slightly better performance than controls in both fixed rotating speed and accelerating rod sessions. The latencies to fall of both groups decreased as rotational speeds increased, but there was neither a significant interaction between session and genotype: MANOVA, $F(1, 37) = 1.064$, $p = .31$, nor a genotype effect on this parameter (see Figure 5). In the accelerating rod task, both groups showed similar latencies to fall (data not shown).

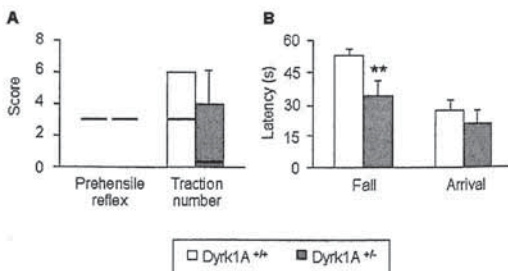


Figure 4. Behavioral analysis in the coat-hanger test. A: The prehensile reflex and traction numbers were assessed during a period of 5 s. Data are medians (\pm interquartile ranges). B: The latency before falling and the time to arrive at one of the ends of the hanger were evaluated during a period of 60 s. Data are means (\pm SEM). *Dyrk1A*^{+/+}, $n = 23$; *Dyrk1A*^{+/-}, $n = 12$. ** $p < .01$.

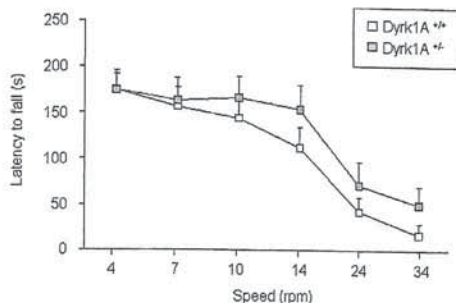


Figure 5. Evaluation of performance on the rotarod during consecutive trials with increasing rotational speeds. Data are the means (\pm SEM) of two independent sessions. *Dyrk1A*^{+/+}, $n = 22$; *Dyrk1A*^{+/-}, $n = 17$. rpm = revolutions per minute.

Grip Strength

Dyrk1A^{+/-} mice showed a significant reduction in vertical force compared with controls: one-way ANOVA, $F(1, 41) = 4.718$, $p = .04$, but no differences in horizontal force compared with controls, $F(1, 41) = 1.684$, $p = .20$ (see Figure 6). Pearson's correlation indicated no correlation between body weight and force reaction (control male: $r = .459$, $p = .10$; control female: $r = .306$, $p = .42$; *Dyrk1A*^{+/-} male: $r = -.027$, $p = .94$; *Dyrk1A*^{+/-} female: $r = .203$, $p = .66$).

Discussion

We have previously reported the generation and general characterization of *Dyrk1A*^{+/-} mice. These mice, carrying one targeted allele of the *Dyrk1A* gene, although smaller than their wild-type littermates and with prominent reduction in some parts of the brain, are fertile and healthy, and appear normal on inspection. *Dyrk1A*^{+/-} mice present some developmental delays, with no severe neurological or behavioral alterations in adulthood (Fotaki et al., 2002).

Several observations have suggested that DYRK1A is involved in the control of motor function. DYRK1A is expressed in brain areas controlling motor function, such as the cerebellum and functionally related structures, most brainstem motor nuclei, and spinal cord (Marti et al., 2003). On the other hand, overexpression of DYRK1A in mice leads to specific motor dysfunction characterized by an impairment of motor learning and alteration of the organization of locomotor behavior (Martínez de Lagrán et al., 2004). Here we demonstrate that mice carrying one targeted allele of the *Dyrk1A* gene show specific alterations in their motor phenotype, both in the preweaning period and in adulthood.

Behavioral testing commenced during the 2nd postnatal week. In this particular period, critical processes that determine the maturation of the nervous system, such as gliogenesis, myelination, and synaptogenesis, are actively taking place in the mouse brain, and the development of the cerebellum is almost completed. DYRK1A is present in high levels in the rat brain during this period (Okui et al., 1999). The majority of the tests performed throughout this period revealed subtle alterations in *Dyrk1A*^{+/-}

mice. However, the only significant differences were observed in pivoting response and climbing activity. The pivoting response consists of an immature pattern of locomotion that in normal mice appears at P7, increases gradually as craniocaudal maturation progresses, and finally disappears at P14 when walking activity is established (Dierssen et al., 2002). Although *Dyrk1A*^{+/-} mice presented this normal maturation pattern, they showed a significant decrease in the number of pivots at P10. At P14, no differences were found, but this result is most probably due to the age-related reduction in pivoting activity in control mice. Besides, although the number of pivots was significantly reduced at P14 with respect to previous stages, the walking activity still had not been properly established in *Dyrk1A*^{+/-} mice, as reflected by the higher latency to initiate walking, thus suggesting a delay in the maturation of nervous system domains involved in motor function. However, we cannot discard a possible influence of hypoactivity in this test. Also, this delay in maturation and/or hypoactivity might be responsible for the reduced climbing ability of *Dyrk1A*^{+/-} mice, because climbing is a complex task that depends on the maturation of walking activity, balance, motor coordination, prehensile reflex, and the muscular force of the animal. In our previous work, we showed that overexpression of *Dyrk1A* in transgenic mice leads to a persistence of the pivoting response, a delay in the maturation of gait, and poorer performance in the wire suspension test (Altafaj et al., 2001). Although in some aspects of performance, such as the wire suspension test, the profiles obtained by over- and underexpression of *Dyrk1A* differ, probably because adequate performance depends on a complex neurological circuit. In contrast, the effects of over- and underexpression on levels of activity or rostrocaudal maturation are different, suggesting a clear gene-dosage effect. The current results provide further evidence of a physiological role of the DYRK1A kinase in the maturation of the neuromotor system and imply a gene-dosage effect in determining this process.

The locomotor activity, motor coordination, and muscular strength of *Dyrk1A*^{+/-} mice were further examined in adulthood. The paw-print test showed a significant decrease in the step distance of *Dyrk1A*^{+/-} mice that cannot be attributed to weight reduction, indicating that the *Dyrk1A* mutation produces a gait disturbance. Complex movements such as locomotion require that muscles contract and relax in a complex repetitive pattern generated by specific central neuronal networks.

The open field was used to evaluate the locomotor activity of the mice in a novel environment. In this test, there is an influence of emotionality that was reduced by performing the task under dimly

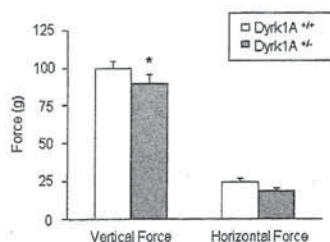


Figure 6. Grip strength test. Data are means (\pm SEM). *Dyrk1A*^{+/+}, $n = 25$; *Dyrk1A*^{+/-}, $n = 17$. * $p < .05$.

lit conditions. There was a significant decrease in activity, as shown by reduction of average speed, total distance traveled, and number of square crossings. Moreover, there was also a reduction in vertical activity, indicating that the dose reduction of DYRK1A produces severe hypoactive behavior. Whether the reduced activity of the mutant mice could be attributed, at least partially, to the change in gait pattern remains to be determined. It is worth mentioning that mutant flies with reduced protein levels of *mbn*, the *Dyrk1A* orthologue in *Drosophila*, present low activity and reduced flight speed (Tejedor et al., 1995). Thus, it seems that the effects of the dose reduction of DYRK1A in two distantly related organisms such as the mouse and fly produce similar effects in motor activity. Overexpression of DYRK1A in mice seems to produce variable phenotypic results. TgDyrk1A mice present a mild hyperactive phenotype that is observed in novelty-related situations, but not in basal conditions (Altafaj et al., 2001), whereas YAC transgenic mice containing DYRK1A (TgYAC157Fte) show normal levels of activity or even slight hypoactivity (Smith et al., 1997). The involvement of DYRK1A in the physiological control of movement is supported by the fact that DYRK1A is expressed in brain regions involved in motor function, such as the granular layer of the cerebellar cortex, the cerebellar nuclei, several central motor nuclei of the medulla and the pons, and the gray matter of the spinal cord (Marti et al., 2003). Taken together, these results suggest a relationship between *Dyrk1A* expression and basal motor activity.

Balance and motor coordination, assessed in a static beam, and motor learning, assessed in a rotating rod, were not altered in *Dyrk1A*^{+/-} mice, thus suggesting that motor coordination and learning are not affected by the haploinsufficiency of *Dyrk1A*. In contrast, in the coat-hanger task, mutant mice presented a significant reduction in the latency to fall off the hanger, whereas their performance in tasks that require motor coordination (number of tractions and crossings and the latency to arrive at the end of the wire), although lower than that of controls, was not significantly impaired. The coat-hanger test differs from the standard beam tests in requiring greater muscular strength, because the mice are suspended upside-down from a horizontally positioned string. A one-way ANOVA revealed a slight but significant genotype effect of the vertical force of *Dyrk1A*^{+/-} mice in the grip-force task. Thus, a reduction in muscle force may account, at least in part, for the reduced falling latency of the *Dyrk1A*^{+/-} mice, but impairment in the maintenance of muscle tone could also contribute to the observed effect.

During this study, certain defects, such as hypoactivity and motor coordination deficits, were observed in both preweaning and adult *Dyrk1A*^{+/-} mice, suggesting on one hand that they could both be functional consequences of a developmental defect. On the other hand, the persistence of particular behavioral deficits may not only be the result of noncompensated developmental disturbances, but might also reflect a functional role of *Dyrk1A* in the adult nervous system.

In the present study, we have characterized the motor deficits displayed by *Dyrk1A*^{+/-} mice and have shown differences in early neuromotor development that persist into adulthood. We have not yet been able to correlate these deficits with concrete histological alterations of the *Dyrk1A*^{+/-} nervous system. *Dyrk1A*^{+/-} mice present a prominent size decrease in the midbrain and hindbrain. In particular, structures such as the superior colliculi present a severe

decrease in size that seems to be due to a reduction in cell numbers (Fotaki et al., 2002). The brain reduction of the *Dyrk1A*^{+/-} mice might also affect other neural populations or neural circuits that support the domains that regulate motor function and muscle tone. Although this possibility should be examined further, the present findings show that correct neuromotor function in mice is affected by the DYRK1A dose reduction and provide additional evidence about an important physiological role of this kinase in the nervous system.

References

- Altafaj, X., Dierssen, M., Baamonde, C., Marti, E., Visa, J., Guimera, J., et al. (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.
- Alvarez, M., Estivill, X., & de la Luna, S. (2003). DYRK1A accumulates in splicing speckles through a novel targeting signal and induces speckle disassembly. *Journal of Cell Science*, *116*, 3099–3107.
- Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., et al. (1996). *Atm*-deficient mice: A paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell*, *86*, 159–171.
- Becker, W., & Joost, H. G. (1999). Structural and functional characteristics of DYRK, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, *62*, 1–17.
- Campbell, L. E., & Proud, C. G. (2002). Differing substrate specificities of members of the DYRK family of arginine-directed protein kinases. *FEBS Letters*, *510*, 31–36.
- Costa, A. C., Walsh, K., & Davisson, M. T. (1999). Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome. *Physiology & Behavior*, *68*, 211–220.
- Dierssen, M., Fotaki, V., Martínez de Lagrán, M., Gratacos, M., Arbones, M., Fillat, C., & Estivill, X. (2002). Neurobehavioral development of two mouse lines commonly used in transgenic studies. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *73*, 19–25.
- Fotaki, V., Dierssen, M., Alcantara, S., Martínez, S., Marti, E., Casas, C., et al. (2002). *Dyrk1A* haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Molecular and Cellular Biology*, *22*, 6636–6647.
- Guimera, J., Casas, C., Estivill, X., & Pritchard, M. (1999). Human *minibrain* homologue (*MNBH/DYRK1*): Characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics*, *57*, 407–418.
- Guimera, J., Casas, C., Pucharcos, C., Solans, A., Domenech, A., Planas, A. M., et al. (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.
- Hammerle, B., Vera-Samper, E., Speicher, S., Arenicibia, R., Martínez, S., & Tejedor, F. J. (2002). *Mnb/Dyrk1A* is transiently expressed and asymmetrically segregated in neural progenitor cells at the transition to neurogenic divisions. *Developmental Biology*, *246*, 259–273.
- Himpel, S., Panzer, P., Eirmbter, K., Czajkowska, H., Sayed, M., Packman, L. C., et al. (2001). Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A. *Biochemical Journal*, *359*, 497–505.
- Himpel, S., Tegge, W., Frank, R., Leder, S., Joost, H. G., & Becker, W. (2000). Specificity determinants of substrate recognition by the protein kinase DYRK1A. *Journal of Biological Chemistry*, *275*, 2431–2438.
- Kentrup, H., Becker, W., Heukelbach, J., Wilmes, A., Schürmann, A., Huppertz, C., et al. (1996). Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine resi-

- dues between subdomains VII and VIII. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 3488–3495.
- Martí, E., Altafaj, X., Dierssen, M., de la Luna, S., Fotaki, V., Alvarez, M., et al. (2003). *Dyrk1A* expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system. *Brain Research*, 964, 250–263.
- Martínez de Lagrán, M., Altafaj, X., Gallego, X., Martí, E., Estivill, X., Sahun, I., et al. (2004). Motor phenotypic alterations in TgDyrk1A transgenic mice implicate DYRK1A in Down syndrome motor dysfunction. *Neurobiology of Disease*, 15, 132–142.
- Meyer, O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C., & Riley, M. T. (1979). A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice. *Neurobehavioral Toxicology*, 1, 233–236.
- Okui, M., Ide, T., Morita, K., Funakoshi, E., Ito, F., Ogita, K., et al. (1999). High-level expression of the *Mnb/Dyrk1A* gene in brain and heart during rat early development. *Genomics*, 62, 165–171.
- Raich, W. B., Moorman, C., Lacefield, C. O., Lehrer, J., Bartsch, D., Plasterk, R. H., et al. (2003). Characterization of *Caenorhabditis elegans* homologs of the Down syndrome candidate gene *DYRK1A*. *Genetics*, 163, 571–580.
- Shindoh, N., Kudoh, J., Maeda, H., Yamaki, A., Minoshima, S., Shimizu, Y., & Shimizu, N. (1996). Cloning of a human homolog of the *Drosophila* minibrain/rat *Dyrk* gene from "the Down syndrome critical region" of chromosome 21. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 225, 92–99.
- Smith, D. J., Stevens, M. E., Sudanagunta, S. P., Bronson, R. T., Makhinson, M., Watabe, A. M., et al. (1997). Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates *minibrain* in learning defects associated with Down syndrome. *Nature Genetics*, 16, 28–36.
- Song, W. J., Sternberg, L. R., Kasten-Sportes, C., Keuren, M. L., Chung, S. H., Slack, A. C., et al. (1996). Isolation of human and murine homologues of the *Drosophila* *minibrain* gene: Human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome "critical region." *Genomics*, 38, 331–339.
- Tejedor, F., Zhu, X. R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., et al. (1995). Minibrain: A new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron*, 14, 287–301.
- Wiechmann, S., Czajkowska, H., de Graaf, K., Grotzinger, J., Joost, H. G., & Becker, W. (2003). Unusual function of the activation loop in the protein kinase DYRK1A. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 302, 403–408.

Received November 26, 2003

Revision received February 16, 2004

Accepted February 23, 2004 ■

Constitutive Dyrk1A is abnormally expressed in Alzheimer disease, Down syndrome, Pick disease, and related transgenic models

Isidro Ferrer,^{a,*} Marta Barrachina,^a Berta Puig,^a M. Martínez de Lagrán,^b
Eulalia Martí,^b Jesús Avila,^c and Mara Dierssen^b

^aInstitut de Neuropatologia, Servei Anatomia Patològica, Hospital Universitari de Bellvitge, carrer Feixa Llarga sn, 08907 Hospitalet de Llobregat, Spain

^bCentre de Regulació Genòmica (CRG), Parc de Recerca Biomèdica, 08003 Barcelona, Spain

^cCentro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Received 30 December 2004; revised 19 February 2005; accepted 13 March 2005
Available online 30 April 2005

DYRK1A, dual-specificity tyrosine-regulated kinase 1A, maps to human chromosome 21 within the Down syndrome (DS) critical region. Dyrk1 phosphorylates the human microtubule-associated protein *tau* at Thr²¹² in vitro, a residue that is phosphorylated in fetal *tau* and hyper-phosphorylated in Alzheimer disease (AD) and tauopathies, including Pick disease (PiD). Furthermore, phosphorylation of Thr²¹² primes *tau* for phosphorylation by glycogen synthase kinase 3 (GSK-3). The present study examines Dyrk1A in the cerebral cortex of sporadic AD, adult DS with associated AD, and PiD. Increased Dyrk1A immunoreactivity has been found in the cytoplasm and nuclei of scattered neurons of the neocortex, entorhinal cortex, and hippocampus in AD, DS, and PiD. Dyrk1A is found in sarkosyl-insoluble fractions which are enriched in phosphorylated *tau* in AD brains, thus suggesting a possible association of Dyrk1A with neurofibrillary tangle pathology. Yet, no clear relationship has been observed between *tau* phosphorylation at Thr²¹², and GSK-3 and Dyrk1A expression in diseased brains. Transgenic mice bearing a triple *tau* mutation (G272V, P301L, and R406W) and expressing hyper-phosphorylated *tau* in neurons of the entorhinal cortex, hippocampus, and cerebral neocortex show increased expression of Dyrk1A in individual neurons in the same regions. However, transgenic mice over-expressing Dyrk1A do not show increased phosphorylation of *tau* at Thr²¹², thus suggesting that Dyrk1A over-expression does not trigger per se hyper-phosphorylation of *tau* at Thr²¹² in vivo. The present observations indicate modifications in the expression of constitutive Dyrk1A in the cytoplasm and nuclei of neurons in various neurodegenerative diseases associated with *tau* phosphorylation.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Dyrk1; Alzheimer disease; Down syndrome; Pick disease; *tau*

Introduction

The *Drosophila minibrain (mnb/dyrk1A)* gene encodes a serine/threonine protein kinase that is required in neuroblast proliferation during post-embryonic neurogenesis (Tejedor et al., 1995). The mammalian homologues (*DYRK1A*: dual-specificity tyrosine-regulated kinase 1) map to human chromosome 21 within the Down syndrome (DS) critical region (Guimerá et al., 1996; Shindoh et al., 1996; Song et al., 1996) and to chromosome 16 in mice (Song et al., 1997). Experimental evidence supports the involvement of MNB/Dyrk1A in several neuropathologies and cognitive deficits of Down syndrome (Chen and Antonarakis, 1997; Hammerle et al., 2003a,b; Altafaj et al., 2001; Martínez de Lagrán et al., 2004). Furthermore, MNBH/Dyrk1A is over-expressed in Down syndrome brains (Guimerá et al., 1999).

Mnb/Dyrk1A is highly expressed in brain and heart during development (Okui et al., 1999). It has been proposed that Dyrk1A participates in brain development. Yang et al. (2001) showed that over-expression of a kinase-deficient *DYRK1A* attenuates the neurite outgrowth induced by a neurogenic factor in immortalized hippocampal cells. In addition, the expression pattern of *Dyrk1A* mRNA and protein at early embryonic ages in mice suggests that it participates in the transition of neuroepithelial cells from proliferating to neurogenic divisions (Hammerle et al., 2002). A second wave of Mnb expression occurs at late development at the time of dendritic tree differentiation, and is initiated by a transient translocation of MNB/Dyrk1A from the cytoplasm to the nucleus (Hammerle et al., 2003a,b). *Dyrk1A* also regulates the development of dendritic trees of neurons (Hammerle et al., 2003a,b), an effect that may depend on the modulation of vesicle trafficking which is dependent on Dynamin (DYN1), a GTPase putative substrate of *DYRK1A*, that plays a fundamental role in synaptic vesicle recycling, clathrin-mediated endocytosis, intracellular membrane trafficking (see Torre et al., 1994 for a review) and neurite outgrowth (Chen-Hwang et al., 2002). Furthermore, Dyrk1A (+/–) mice show decreased brain size, changes in neuron density in some

* Corresponding author.

E-mail address: 8082ifa@comb.es (I. Ferrer).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

brain regions and decreased number of neurons in the superior colliculus in (Fotaki et al., 2002) along with a reduction in the size of the basal dendritic tree and the number of dendritic spines in cortical pyramidal cells (Benavides et al., in press). Furthermore, over-expression of full-length cDNA of Dyrk1A results in delayed cranio-caudal maturation and impairment in cognitive flexibility and spatial learning, specifically related to reference memory, together with altered motor development and hyperactivity (Altafaj et al., 2001; Martinez de Lagran et al., 2004).

In addition to the developing brain, Dyrk1A is expressed in selected regions of the cerebrum, cerebellum, and brain stem in the adult rat central nervous system (Marti et al., 2003). Moreover, subcellular studies in primary cultures of the cerebellum have shown the presence of Dyrk1A in the nucleus and cytoplasm of neurons and astrocytes, and in both the nuclear and cytoplasm-enriched fractions in whole adult brain homogenates (Marti et al., 2003). Mnb/Dyrk1A is also expressed in the developing and adult human brain in both cell nucleus and cytoplasm of neurons (Wegiel et al., 2004). However, little is known about the function of Dyrk1A in the adult brain.

Dyrk1A has been reported to phosphorylate a myriad of substrates both located in the nuclear and cytoplasmic compartments, thus suggesting that the subcellular localization of the protein may determine its functional role in the cell. Of interest to human neurodegenerative pathology, Dyrk1 phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser³⁵⁹, and permits phosphorylation of Ser⁵³⁵ by glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) (Woods et al., 2001a,b). Dyrk1 also phosphorylates the human microtubule-associated protein *tau* at Thr²¹² in vitro, a residue that is phosphorylated in fetal *tau* and hyperphosphorylated in Alzheimer disease (AD) and tauopathies (Woods et al., 2001a,b). Furthermore, phosphorylation of Thr²¹² primes *tau* for phosphorylation by GSK-3 at Ser²⁰⁸ in vitro, suggesting a general role for Dyrk1 in *tau* phosphorylation (Woods et al., 2001a,b).

Alzheimer disease (AD) is characterized by A β amyloid plaques (senile plaques) which are mainly derived from the abnormal cleavage of the amyloid precursor protein (APP) and by the accumulation of hyper-phosphorylated *tau* in neurofibrillary tangles, neuropil threads, and aberrant neurites surrounding amyloid plaques (Duyckaerts and Dickson, 2003). Tauopathies (including Pick's disease: PiD) are characterized by distinct accumulation of hyper-phosphorylated *tau* in neurons and glial cells (Bergeron et al., 2003; Dickson, 1999). Since hyper-phosphorylation of *tau* in AD and tauopathies is dependent on the action of several kinases and phosphatases, and distinct active kinases are expressed in association with phospho-*tau* deposits in neurons and glial cells in these diseases (Avila et al., 2004; Buée et al., 2000; Ferrer et al., 2005; Lee et al., 2001), it would be interesting to explore whether Dyrk1A is also expressed in relation with phospho-*tau* deposits in AD and tauopathies. Moreover, adults with Down syndrome invariably develop AD at ages that are not usual in sporadic AD (Kemper, 1991). Although intraneuronal A β -amyloid precedes development of A β -amyloid plaques and *tau* pathology in Down syndrome (Gyure et al., 2001), whether or not Dyrk1A is a contributory factor of *tau* hyper-phosphorylation and to AD pathology in Down syndrome is not known.

The present study examines the expression levels of Dyrk1A, by gel electrophoresis and Western blotting, in the cerebral cortex of sporadic AD, and DLBp, DLBc compared with age-matched controls. Dyrk1A immunohistochemistry was carried out in the brains of cases with Down syndrome with associated AD, sporadic

AD, DLB, PiD, and other unrelated neurodegenerative disorders. Subcellular localization of Dyrk1A was also examined in sarkosyl-insoluble fractions enriched in paired helical filaments in AD cases. Finally, adult triple *tau* transgenic mice over-expressing hyper-phosphorylated *tau* were examined for Dyrk1A immunohistochemistry, and Dyrk1A transgenic mice were used to examine phospho-*tau* Thr²¹² expression.

Materials and methods

Brain samples and general procedures

The brains of five cases with AD stages I–IIA and four with AD stage VC of Braak and Braak (1999), three with PiD, and five of age-matched controls, were obtained at autopsy, following informed consent of the patients or their relatives and the approval of the local ethics committee. Both genders were represented equally; age range was between 60 and 89 years, and the time between death and tissue processing was between 1 and 7 h. Half of the brain was immediately cut on coronal sections, 1 cm thick, frozen on dry ice and stored at -80°C until use. In addition, samples 2 mm thick of the cerebral isocortex, cingulum, hippocampus and entorhinal cortex, and brain stem were fixed with 4% paraformaldehyde for 24 h, cryoprotected with 30% saccharose, frozen on dry ice and stored at -80°C until use. The brains of two cases with Down syndrome and associated AD stage VC (two men aged 45 and 44 years) were examined for immunohistochemistry. For morphological examinations, the brains were fixed by immersion in 10% buffered formalin for 2 or 3 weeks. The neuropathological study was carried out on de-waxed 4- μm -thick paraffin sections of the frontal (area 8), primary motor, primary sensory, parietal, temporal superior, temporal inferior, anterior cingulate, anterior insular, and primary and associative visual cortices; entorhinal cortex and hippocampus; caudate, putamen, and pallidum; medial and posterior thalamus; subthalamus; Meynert nucleus; amygdala; midbrain (two levels), pons and bulb; and cerebellar cortex and dentate nucleus. The sections were stained with hematoxylin and eosin and Klüver Barrera, and for immunohistochemistry to glial fibrillary acidic protein (rabbit GFAP 1:250, Dako, Barcelona, Spain), CD68 (mouse 1:100, Dako) for microglia, A β -amyloid (A β _{41–40}, A β _{41–42}, Dr. Sarasa, Zaragoza, Spain; rabbit 1:500 and 1:200, respectively), phosphorylation-specific *tau* Thr¹⁸¹, Ser²⁰², Ser²¹⁴, Ser²⁶², Ser³⁹⁶ and Ser⁴²² (rabbit 1:100, Calbiochem, Bionova, Madrid, Spain), and α B-crystallin (Novocastra, Newcastle, UK), α -synuclein (rabbit 1:500, Chemicon, Hofheim, Germany) and ubiquitin (rabbit 1:200, Dako), following the streptavidin LSAB method (Dako).

Staging of AD was according to Braak and Braak (1999). Stages of neurofibrillary pathology correspond to transentorhinal (I–II), limbic (III–IV), and neocortical (V and VI). Stages of amyloid deposition refer to initial deposits in the basal neocortex (stage A), deposits extended to the association areas of the neocortex (stage B), and heavy deposition throughout the entire cortex (stage C). Cases with PiD were classified following well-established neuropathological criteria (Bergeron et al., 2003; Dickson, 1999). The main clinical and neuropathological data in the present series are summarized in Table 1.

Biochemical studies were carried out in frozen samples of the frontal cortex (area 8) in AD cases, and controls. Control and diseased brains were processed in parallel.

Table 1
Summary of the main clinical and neuropathological findings of the cases in the present series used for morphological and biochemical studies

Case	Disease	Gender	Age (years)	Post-mortem (h)
1	Control	F	65	4
2	Control	F	73	5
3	Control	M	75	6
4	Control	M	79	7
5	Control	F	80	3
6	ADIIA	F	73	4
7	ADIIA	M	75	4
8	ADIIB	M	78	7
9	ADIIB	F	79	5
10	ADIIB	F	84	5
11	ADVIC	M	81	3
12	ADVC	F	82	5
13	ADVC	F	84	2
14	ADVIC	F	89	1
15	PiD	M	65	1
16	PiD	M	68	6
17	PiD	F	66	4
18	Down (+ADVC)	M	45	4
19	Down (+ADVC)	M	44	6

Alzheimer disease stage ADIIA/B and V–VIC of Braak and Braak (1999), Pick disease (PiD), Down syndrome with AD (Down + AD), and controls. M: male, F: female.

Specific immunohistochemical studies were carried out in paraformaldehyde-fixed cryoprotected sections of the frontal cortex, and entorhinal cortex and hippocampus. Three sections per area in every case were processed free-floating for Dyrk1A, GSK-3 β Ser⁹, GSK-3Tyr^{279/216}, and phospho-*tau* Thr²¹² immunohistochemistry. Anti-Dyrk1A antibodies (Marti et al., 2003) were used at a dilution of 1:500. Anti-GSK-3 β Ser⁹ (rabbit, Calbiochem) and anti-GSK-3Tyr^{279/216} (mouse, Upstate Biotech, Lake Placid, NY) were used at dilutions of 1:100. Anti-phospho-*tau* Thr²¹² (Calbiochem) was used diluted 1:250. After washing, the sections were incubated with link solution (LSAB, Dako) and with streptavidin–peroxidase solution for 15 min each at room temperature. The peroxidase reaction was then visualized, as a dark blue precipitate, with NH₄NiSO₄ (0.05 M) in phosphate buffer (0.1 M), 0.05% diaminobenzidine, NH₄Cl, and 0.01% hydrogen peroxide. Blank sections stained only with the secondary antibodies were used as negative controls.

Semi-quantitative studies were carried out by counting the number of positive neurons (increased Dyrk1A immunoreactivity in the cytoplasm or in the nuclei) in the frontal cortex (area 8) and dentate gyrus in four random areas per region in every case at a magnification of $\times 400$. Results were roughly expressed as the percentage of positive neurons in relation with the total number of neurons per arbitrary area.

Gel electrophoresis and Western blotting

Frozen frontal cortex (100 mg) was directly homogenized in 1 ml lysis buffer (20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DDT, 2 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, leupeptin, and pepstatin) and then sonicated. Lysates were centrifuged at 5000 rpm for 10 min at 4°C, and protein concentrations were determined with BCA (Pierce, Rockford, USA) method. 20 μ g of total protein was boiled at 95°C for 3 min and loaded in SDS-

polyacrylamide gels with Tris–glycine running buffer. Proteins were electrophoresed using a mini-protean system (Bio-Rad, Barcelona, Spain) and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) with a Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) for 45 min at 40 mA. Nitrocellulose membranes were blocked with Tween 20 TBS (TBST) containing 5% skimmed milk for 30 min. Subsequently, the membranes were incubated at 4°C overnight with one of the primary antibodies in TBST containing 3% BSA. The following antibodies were used: anti-Dyrk1A at a dilution of 1:500 and anti- β -actin (clone AC-74, Sigma, Madrid, Spain) at a dilution of 1:1,000. After primary antibody incubation, the membranes were washed three times with TBST for 5 min at room temperature, and then incubated with anti-mouse IgG antibody labeled with horseradish peroxidase (Dako) at a dilution of 1:1000 for 1 h at room temperature. Subsequently, the membranes were washed four times, 5 min each, with TBST at room temperature, and developed with the chemiluminescence ECL Western blotting system (Amersham/Pharmacia, England) followed by apposition of the membranes to autoradiographic films (Hyperfilm ECL, Amersham).

Data analysis

The densitometric quantification of Western blot bands was carried out with the TotalLab v2.01 software. This software detects the bands obtained by Western blot and gives individual values which are dependent on the light quantification of the corresponding band. The results were normalized for β -actin. The mean values and standard deviations were determined for control and pathological samples. ANOVA with post hoc LSD test was performed with Statgraphics plus 5.0 software.

Examination of sarkosyl-insoluble fractions

Fresh samples from the frontal cortex of AD stage V (about 0.6 g) were homogenized in a glass tissue grinder in 10 vol (w/v) of cold suspension buffer consisting of 10 mM Tris–HCl (pH = 7.4), 0.8 M NaCl, 1 mM EGTA, 10% sucrose, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, and 5 μ g/ml pepstatin. The homogenates were first centrifuged at 20,000g, and the supernatant (S1) was retained. The pellet (P1) was re-homogenized in 5 vol of homogenization buffer and re-centrifuged. The two supernatants (S1 + S2) were then mixed and incubated with *N*-lauroylsarcosinate 1% for 1 h at room temperature while shaking. Samples were then centrifuged for 1 h at 100,000g in a Ti 70 Beckman rotor. Sarkosyl-insoluble pellets (P3) were re-suspended (0.2 ml/g of starting material) in 50 mM Tris–HCl (pH = 7.4). Protein concentrations were determined by the BCA method and 10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was run using a mini-protean system (Bio-Rad). 50 μ g of protein was loaded in each lane with loading buffer containing 0.125 M Tris (pH = 6.8), 20% glycerol, 10% mercaptoethanol, 4% SDS, and 0.002% bromophenol blue. Samples were heated at 95°C for 5 min prior to gel loading. The proteins were then transferred to nitrocellulose membranes (Amersham) using an electrophoretic chamber system (Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad). Non-specific binding sites were blocked with Tris-buffered saline solution pH = 7.4 with 0.1% Tween-20 (TBST) containing 5% skimmed milk for 30 min, and incubated with one of the primary antibodies for 1 h at room temperature. The Dyrk1A antibody

was diluted 1:500. The rabbit polyclonal antibody to phospho-*tau* Thr²¹² was diluted 1:500. After washing, the membranes were incubated with the secondary antibody labeled with horseradish peroxidase (Dako) diluted 1:1000 for 1 h at room temperature, washed again, and developed with the chemiluminescence ECL Western Blotting system (Amersham). Membranes were then exposed to autoradiographic films (Hyperfilm ECL, Amersham).

Dyrk1A transgenic mice

The production of mice transgenic for *Dyrk1A* (TgDyrk1A) has previously been described (Altafaj et al., 2001). Two lines of transgenic mice with insertion of the transgene in several chromosomes were used in order to exclude positional effects.

The non-transgenic littermates of TgDyrk1A mice served as controls. Animals were group-housed under a 12-h light/dark schedule (lights on at 9:00 a.m.) in controlled environmental conditions of humidity (60%) and temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) with free access to food and water. Only males were tested in this study. Five- and 24-month-old males were used ($n = 4$ per group, and equal number of corresponding age-matched littermates in the aged and $n = 3$ WT and $n = 5$ TgDyrk1A in the group of young animals were used).

Triple tau transgenic mice

Transgenic mice expressing a 4-repeat isoform of *tau* containing the mutations G272V, P301L, and R406W have been generated by using the Thy-1 promoter in a C57B16jxCBA hybrid background (Lim et al., 2001). The brains of these mice have high levels of mutant *tau* in hippocampus and cortex, as well as *tau* hyper-phosphorylation at specific sites, as recognized with the phosphorylation-dependent antibodies AT180 (Thr²³¹) and AT8 (Ser^{199/202}), but not with the antibody PHF1 (Ser^{396/404}) (Lim et al., 2001). Nine- and 16-month-old males were used ($n = 4$ per age group), and an equal number of corresponding age-matched littermates was used.

Immunohistochemistry in transgenic mice

For immunohistochemical analysis, mice were deeply anesthetized with CO₂ and then perfused intracardially with 50 ml of 0.1 M PBS (phosphate buffer saline, pH = 7.4) followed by 100 ml of chilled 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma). The brains were post-fixed with 4% PFA at 4°C overnight and then cryoprotected overnight in 30% sucrose solution. Serial 50 μm coronal sections were obtained using a cryostat and maintained in cryoprotected solution (30% glycerol, 30% poly-ethylenglycol, 40% 0.1 M PBS). Serial tissue sections were processed in triplicate in every mice for every immunohistochemical method. Control and diseased brains were processed in parallel. Incubation with only the secondary antibodies was used as a control of the immunostaining.

Results

Western blots of homogenates from human frozen frontal cortex showed that Dyrk1A protein levels were not significantly modified in AD when compared with control samples. Interestingly, no significant differences were obtained in AD stages I–II and AD stages V/VI (ANOVA with post hoc LSD test) (Fig. 1).

Dyrk1A immunoreactivity in human control brains was observed in the cytoplasm of neurons in the frontal cortex, entorhinal cortex, and hippocampus (Fig. 2A), and in astrocytes in the subcortical white matter (Fig. 2B). Increased Dyrk1A immunoreactivity was seen in the cytoplasm of occasional neurons in the frontal cortex (Fig. 2C), entorhinal cortex (Fig. 2D), and pyramidal cell layer of the CA1 area of the hippocampus in cases with AD. Dyrk1A antibodies did not recognize neuropil threads or dystrophic neurites surrounding amyloid deposits of senile plaques. No differences were seen between AD cases stages I–II and AD cases stages V–VI. Neurons with increased Dyrk1A immunoreactivity were variable from one case to another and from one region to another in a given case. In any case, the number of neurons with increased Dyrk1A immunoreactivity varied from 1 to 8% in the CA1 area of the hippocampus in AD cases. In spite of

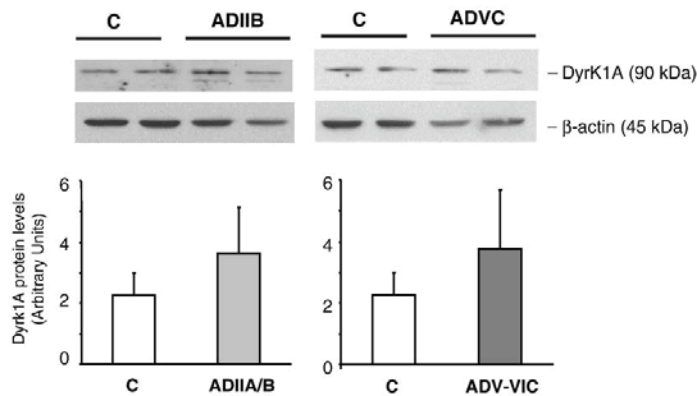


Fig. 1. Dyrk1A protein levels as detected by gel electrophoresis and Western blotting in total homogenates of the frontal cortex (area 8) of controls (C) and Alzheimer disease (AD) stages IIA/B (ADI) and V–VIC (ADV) of Braak and Braak (1999). Western blots are representative of samples indicated in Table 1. Densitometry of Dyrk1A was carried out after normalization by β -actin protein levels in each sample by using TotalLab software. Values correspond to all AD and control samples listed in Table 1 (five controls; five AD stages IIA/B, and four AD stages V–VI/C). No significant differences were found among all the samples analyzed (ANOVA with post hoc LSD test).

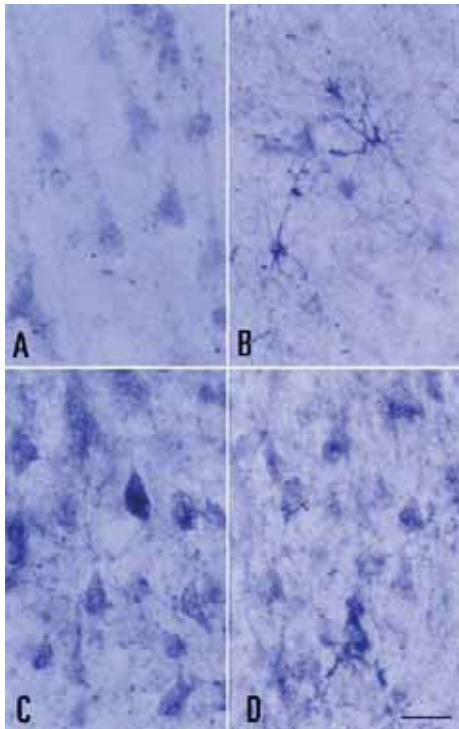


Fig. 2. Dyrk1A immunoreactivity in neurons of the frontal cortex (A) and in astrocytes of the subcortical white matter (B) in a control brain. Increased Dyrk1A immunoreactivity is seen in scattered neurons in the frontal cortex (C) and entorhinal cortex (D) in AD. Cryostat sections processed free-floating. Scale bar = 25 μ m.

these differences, it was clear that no neurons with increased Dyrk1A immunoreactivity were observed in control cases.

Dyrk1A immunoreactivity was also observed in reactive astrocytes, some of them surrounding senile plaques, in AD cases, and in PiD (data not shown). Oligodendrocytes were not stained with anti-Dyrk1A antibodies.

Dyrk1A immunoreactivity was also present in the nuclei of isolated neurons in the cerebral cortex of control cases. Increased numbers of Dyrk1A-immunoreactive nuclei were found in the frontal cortex, entorhinal cortex, and hippocampus in AD stages V–VI (Fig. 3A), but not in neurons of the dentate gyrus in the same cases (Fig. 3B). Finally, increased Dyrk1A immunoreactivity was found in the nuclei of neurons in the frontal cortex (Fig. 3C), entorhinal cortex, CA1 area of the hippocampus, and granular neurons of the dentate gyrus (Fig. 3D) in PiD. Again, the number of nuclei with increased Dyrk1A immunoreactivity varied from one case to another. The percentage of positive neuronal nuclei in the frontal cortex (area 8) was about 0.5%, 10%, and 5% in control, AD, and PiD cases. The percentage of positive nuclei in the dentate gyrus was 0.5% in control and AD cases and 60% in PiD cases.

To further analyze a possible relationship between Dyrk1A, GSK-3, and *tau* phosphorylation, serial sections of the hippocampus of AD cases were processed for Dyrk1A, GSK-3 β Ser⁹, GSK-3Tyr^{279/216}, and phospho-*tau* Thr²¹². Phospho-*tau* antibodies disclosed large numbers of neurofibrillary tangles, neuropil threads, and dystrophic neurites of senile plaques (Fig. 4A). Yet,

only a few tangles were recognized with anti-GSK-3 β Ser⁹ (Fig. 4B) and anti-GSK-3Tyr^{279/216} antibodies (Fig. 4C). Only a few neurons were stained with anti-Dyrk1A antibodies (Fig. 4D).

Similar results were obtained in Down syndrome with concomitant AD. Although large numbers of neurofibrillary tangles were present in sections stained with specific anti-phospho-*tau* Thr²¹² antibodies, smaller numbers of neurons were stained with anti-GSK-3 β Ser⁹ and anti-GSK-3Tyr^{279/216}, whereas very few cells were strongly immunoreactive to anti-Dyrk1A (Fig. 5).

To learn whether fractions enriched in paired helical filaments contained Dyrk1A, Western blots of sarkosyl-insoluble fractions were carried out in two AD cases and one control. AD cases showed the characteristic pattern of phospho-*tau* (anti-phospho-*tau* Thr²¹²) with three bands of 68, 64, and 60 kDa; no *tau* immunoreactivity was observed in the control. A single Dyrk1A-immunoreactive band of 90 kDa was recovered in the same stripped membranes in AD cases but not in the control case processed in parallel (Fig. 6).

The question of whether increased *tau*-phosphorylation was associated with increased Dyrk1A expression was addressed in transgenic mice bearing a pathogenic triple *tau* mutation. Increased phospho-*tau* Thr²¹² immunoreactivity was found in the entorhinal cortex, neocortex, and hippocampus in these animals, in accordance with previous results (Ferrer et al., 2005; Lim et al., 2001). Slightly increased Dyrk1A immunoreactivity was found in

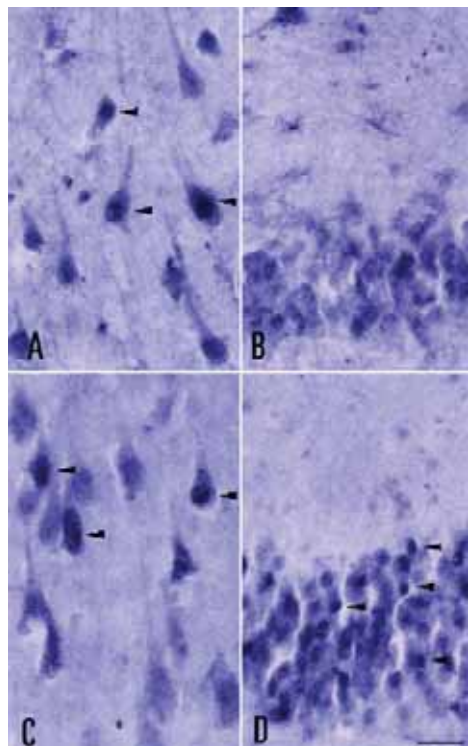


Fig. 3. Dyrk1A immunoreactivity is observed in many neuronal nuclei in the hippocampus (A) but not in granular neurons of the dentate gyrus (B) in AD. Dyrk1A-positive nuclei are seen in the frontal cortex (C) and granular neurons of the dentate gyrus (D) in PiD. Stained nuclei are marked with arrowheads. Cryostat sections processed free-floating. Scale bar = 25 μ m.

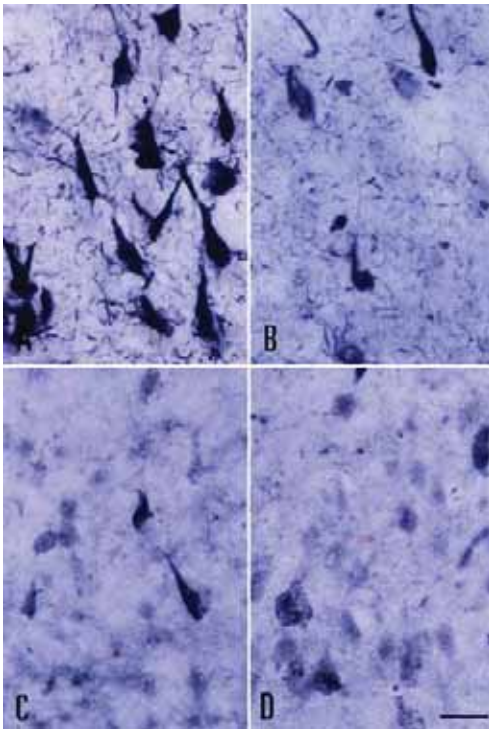


Fig. 4. Phospho-*tau*Thr²¹² (A), GSK-3βSer⁹ (B), GSK-3Tyr^{279/216} (C), and Dyrk1A (D) immunoreactivity in similar areas in the CA1 region of the hippocampus in AD. Phospho-*tau* antibodies disclose large numbers of neurofibrillary tangles and neuropil threads. This contrasts with the scarce number of neurons with increased Dyrk1A immunoreactivity. Many neurofibrillary tangles are stained with anti-GSK-3βSer⁹, but a few are stained with anti-GSK-3Tyr^{279/216} antibodies. Cryostat sections processed free-floating. Scale bar = 25 μm.

scattered neurons in the same regions in transgenic mice aged 9 and 12 months when compared with age-matched non-transgenic littermates (Fig. 7). Dyrk1A immunoreactivity was observed in the cytoplasm. Nuclear Dyrk1A immunoreactivity was not found in any case.

Finally, phospho-*tau* Thr²¹² expression was tested in TgDyrk1A mice. No differences in phospho-*tau* Thr²¹² immunoreactivity were seen in transgenic versus age-matched non-transgenic littermates at any age examined (Fig. 8).

Discussion

The present results have shown increased Dyrk1A immunoreactivity in the cytoplasm and nuclei of scattered neurons of the neocortex, entorhinal cortex, and hippocampus in AD, adult Down syndrome with associated AD pathology, and PiD. This is not accompanied by increased Dyrk1A expression levels as revealed with Western blots, suggesting that changes are restricted to a limited number of neurons which are diluted in total cortical homogenates.

Enhanced Dyrk1A immunoreactivity in the cytoplasm occurs in diseases with associated hyper-phosphorylated *tau* pathology in

neurons, including AD, Down syndrome with AD, and PiD. Similar increased Dyrk1A immunoreactivity occurs in the frontal cortex in AD stages II (with no *tau* pathology in the frontal cortex) and AD stage V (with hyper-phosphorylated *tau* neurofibrillary tangles and neuropil threads in the neocortex). Interestingly, no Dyrk1A immunoreactivity is found in dystrophic neurites of senile plaques or in neuropil threads in AD.

Dyrk1A activity is dependent on the autophosphorylation of a conserved tyrosine residue in the activation loop (Himpel et al., 2001; Kentrup et al., 1996). Dyrk1 phosphorylates *tau* at Thr²¹², and phosphorylation of Thr²¹² primes *tau* for phosphorylation by GSK-3β at Ser²⁰⁸ in vitro, suggesting a general role for Dyrk1 in *tau* phosphorylation (Woods et al., 2001a,b). Hyper-phosphorylation of *tau* at Thr²¹² occurs in a large number of neurons with neurofibrillary tangles in AD, Down syndrome with associated AD, and in Pick bodies in PiD. Phosphorylation of GSK-3β at Ser⁹ and of GSK-3 at Tyr^{279/216} occurs in a variable number of neurons bearing *tau* pathology in AD and other tauopathies (Ferrer et al., 2002, 2003; Pei et al., 1999). Serial sections in AD and Down syndrome cases reveal, however, a poor correlation between *tau* phosphorylation at Thr²¹², GSK-phosphorylation at Ser⁹ and Tyr^{279/216}, and Dyrk1A immunoreactivity. This is not a rare situation, considering that phosphorylation of *tau* at Thr²¹² can be carried out by several kinases, including mitogen-activated protein

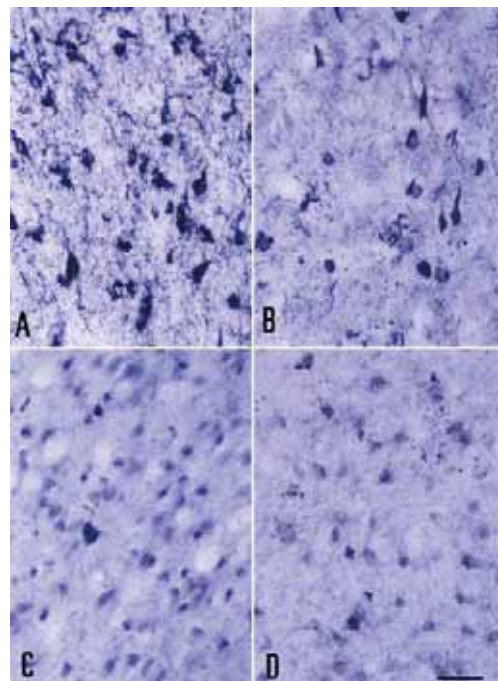


Fig. 5. Phospho-*tau*Thr²¹² (A), GSK-3βSer⁹ (B), GSK-3Tyr^{279/216} (C), and Dyrk1A (D) immunoreactivity in the entorhinal cortex in Down syndrome. Phospho-*tau* antibodies disclosed large numbers of neurofibrillary tangles, neuropil threads, and dystrophic neurites of senile plaques. Yet, only a few neurons are strongly stained with anti-Dyrk1A antibodies. Many neurofibrillary tangles and neurites of senile plaques are stained with anti-GSK-3βSer⁹ but few neurons are decorated with anti-GSK-3Tyr^{279/216} antibodies. Cryostat sections processed free-floating. Scale bar = 50 μm.

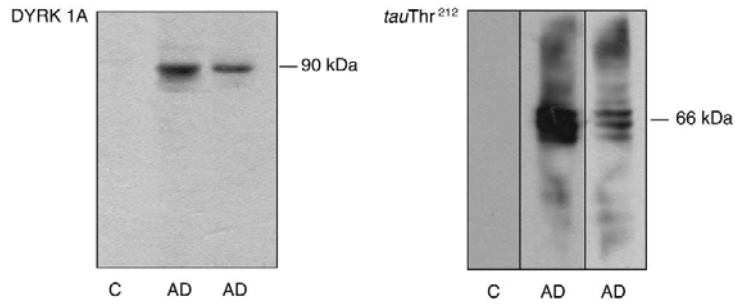


Fig. 6. Sarkosyl-insoluble fractions in control (C) and AD (AD) cases blotted with anti-phospho-*tau*Thr²¹² antibodies (left panel) showing typical bands of phospho-*tau* in AD (68, 64, and 60 kDa). Dyrk1A immunoreactivity (90 kDa) is recovered in these fractions in AD but not in control cases (right panel). Incubation with Dyrk1A antibodies in the same stripped membranes. Exposition time for Dyrk1A in the control and middle lanes was 3 min; exposition time of the lane on the right was 5 min.

kinase ERK-2, stress-associated c-Jun N-terminal kinase (SAPK-JNK), p38 MAP kinase, and GSK (Anderton et al., 2001). A possibility is that Dyrk1A phosphorylates Thr²¹² in *tau* protein and it primes *tau* phosphorylation by GSK3 at Ser²⁰⁸, a serine that is modified in AD (Morishima-Kawashima et al., 1995). Another possibility is that *tau* phosphorylation at Thr²¹², by

Dyrk1A, may affect the binding of *tau* to membrane proteins (Brandt et al., 1995), as *tau* protein contains the PXXP domain (Ser^{213–216} next to Thr²¹²) that could interact with proteins containing SH3 domains (Avila et al., 2004). Dyrk1A is found in sarkosyl-insoluble fractions which are enriched in phosphorylated *tau* in AD brains, thus suggesting a possible association of Dyrk1A with neurofibrillary tangle pathology. A

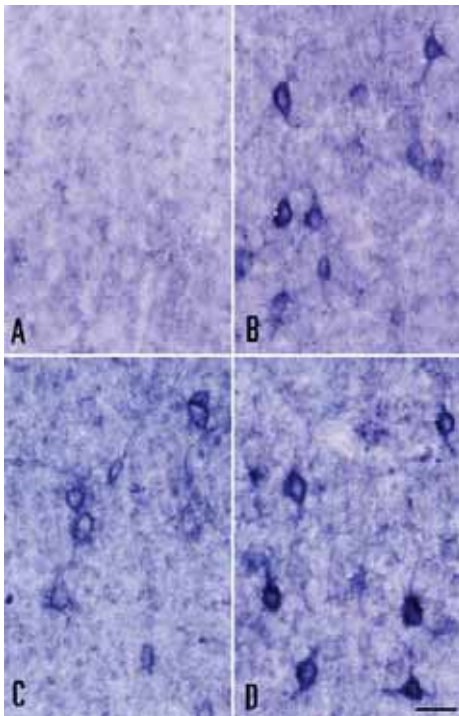


Fig. 7. Phospho-*tau*Thr²¹² in the parietal cortex of triple *tau* transgenic mice aged 16 months (B) and in age-matched controls (A). Phospho-*tau* immunoreactivity is found only in triple transgenic mice. Dyrk1A immunoreactivity in similar areas of the same animals showing slight increase in Dyrk1A immunoreactivity in transgenic mice (D) when compared with age-matched controls (C). Cryostat sections processed free-floating. Scale bar = 25 μ m.

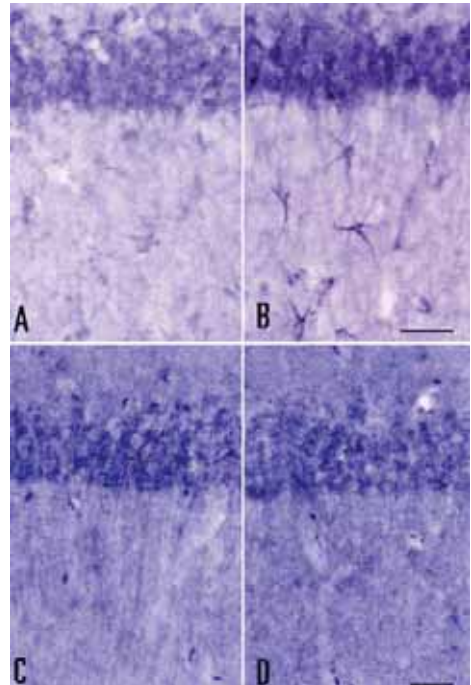


Fig. 8. Increased Dyrk1A immunoreactivity is observed in pyramidal neurons of the hippocampus and in astrocytes of the plexiform layers in TgDyrk1A mice (B) when compared with age-matched littermates (A). Yet, similar phospho-*tau*Thr²¹² immunoreactivity is observed in pyramidal neurons of the hippocampus in TgDyrk1A mice (C) when compared with controls (D). Cryostat sections processed free-floating. Panels A and B, scale bar in panel B = 25 μ m; panels C and D, scale bar in panel D = 25 μ m.

similar pattern occurs for other kinases related with *tau* phosphorylation in vitro (Ferrer et al., 2005). However, this localization does not demonstrate a direct participation of Dyrk1A in *tau* phosphorylation in AD.

The examination of transgenic mice bearing a triple *tau* mutation and expressing hyper-phosphorylated *tau* in neurons of the entorhinal cortex, hippocampus, and cerebral neocortex (Lim et al., 2001) has been useful for the demonstration of increased expression of Dyrk1A in individual neurons in the same regions. Yet, transgenic mice over-expressing Dyrk1A (Altafaj et al., 2001) do not show increased phosphorylation of *tau* at Thr²¹², thus suggesting that Dyrk1A over-expression does not trigger per se hyper-phosphorylation of *tau* at Thr²¹² in vivo.

Taken together, these observations indicate the association of Dyrk1A with pathology of neurons but they do not prove the involvement of Dyrk1A in *tau* phosphorylation in AD, Down syndrome, and PiD. In line with this conclusion is the observation of increased Dyrk1A immunoreactivity in the cytoplasm of reactive astrocytes in AD and PiD, and in unrelated conditions such as gliotic scars.

Finally, increased Dyrk1A immunoreactivity has been found in the nuclei of scattered neurons in AD and PiD, but not in transgenic mice. Dyrk1A has the capacity to activate several transcription factors including CREB (Yang et al., 2001), FOXO (Woods et al., 2001a,b), and Gli1 (Mao et al., 2002). Dyrk1A also has the capacity to phosphorylate cyclin L2 in vitro (De Graaf et al., 2004), and recent studies have shown Dyrk1A over-expression in transgenic mice associated with high levels of cyclin B1, indicating a correlation between Dyrk1A over-expression and cell cycle protein alteration in vivo (Branchi et al., 2004). Thus, increased Dyrk1A immunoreactivity in the nuclei of individual neuronal populations supports the concept that Dyrk1A may participate in the regulation of gene transcription in diseased brains. Strikingly, Dyrk1A nuclear immunoreactivity is not observed in neurons of the dentate gyrus in AD, which do not contain hyper-phosphorylated *tau* deposits, but it is seen in similar neurons in PiD which are characterized by the presence of *tau*-immunoreactive Pick inclusions. However, these coincidences do not imply that nuclear Dyrk1A expression is dependent on *tau* hyper-phosphorylation, but rather that the expression of Dyrk1A in the nucleus is augmented in particular disease-dependent sensitive neurons. This finding is of relevance since Dyrk1A has been shown to activate both nuclear and cytoplasmic substrates, and the specific signals that activate Dyrk1A translocation to the nucleus are largely undiscovered. Whether transient Dyrk1A translocation from the cytoplasm to the nucleus in disease is associated with some positive effect on dendrites, as suggested during development (Hammerle et al., 2002), thus contrasting degeneration by mechanisms used earlier during maturation and connectivity, is not known.

In summary, the present observations indicate modifications in the expression of constitutive Dyrk1A in the cytoplasm and nuclei of neurons in various human neurodegenerative conditions, including AD, Down syndrome, and PiD. Yet, there is no evidence that Dyrk1A is directly implicated in *tau* phosphorylation in AD and in human and animal tauopathies. Further studies are needed to understand whether post-transcriptional modifications of Dyrk1A (particularly phosphorylation) are more closely related with *tau* deposits. Additional effort is also necessary to identify the target genes of Dyrk1A that are activated in diseased states.

Acknowledgments

This work was supported in part by FIS PI020004, PI030032, CIEN C03-006, and Jérôme Lejeune Foundation. We wish to thank T. Yohannan for editorial advice.

References

- Altafaj, X., Dierssen, M., Baamonde, C., Martí, E., Visa, J., Guimerá, J., Oset, M., Gonzalez, J.R., Florez, J., Fillat, C., Estivill, X., 2001. Neurodevelopment delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice over-expressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1915–1923.
- Anderton, B.H., Betts, J., Blackstock, W.P., Brion, J.P., Chapman, S., Connell, J., Dayanandan, R., Gallo, J.M., Gibb, G., Hanger, D.P., Hutton, M., Kardalidou, E., Leroy, K., Lovestone, S., Mack, T., Reynolds, C.H., van Slegtenhose, M., 2001. Sites of phosphorylation in *tau* and factors affecting their regulation. In: O'Neill, C., Anderton, B. (Eds.), *Neuronal Signal Transduction and Alzheimer's Disease*, Biochemical Society Symposium, vol. 67. Portland Press, Eynsham, UK, pp. 73–80.
- Avila, J., Lucas, J.J., Perez, M., Hernandez, F., 2004. Role of *tau* protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol. Rev.* 84, 361–384.
- Bergeron, C., Morris, H.R., Rossor, M., 2003. Pick's disease. In: Dickson, D. (Ed.), *Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders*. ISN Neuropathol Press, Basel, pp. 124–131.
- Braak, H., Braak, E., 1999. Temporal sequence of Alzheimer's disease-related pathology. In: Peters, A., Morrison, J.H. (Eds.), *Neurodegenerative and Age-related Changes in Structure and Function of Cerebral Cortex*, Cerebral Cortex, vol. 14. Kluwer Academic Press, New York, pp. 475–512.
- Branchi, I., Bichler, Z., Minghetti, L., Delabar, J.M., Malchiodi-Abedi, F., Gonzalez, M.C., Chettouch, Z., Nicolini, A., Chabert, C., Smith, D.J., Rubin, E.M., Migliore-Samour, D., Alleva, E., 2004. Transgenic mouse in vivo library of human Down syndrome critical region 1: association between Dyrk1A over-expression, brain development abnormalities, and cell cycle progression. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 429–440.
- Brandt, R., Leger, J., Lee, G., 1995. Interaction of *tau* with the neural plasma membrane mediated by *tau*'s terminal projection domain. *J. Cell Biol.* 131, 1327–1340.
- Buée, L., Bussiére, T., Buée-Cherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R., 2000. *Tau* protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* 33, 95–130.
- Chen, H., Antonarakis, S.E., 1997. Localisation of a human homologue of the *Drosophila* *mnb* and rat Dyrk genes to chromosome 21q22.2. *Hum. Genet.* 99, 262–265.
- 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. *J. Biol. Chem.* 277, 17597–17604.
- De Graaf, K., Hekerman, P., Spelten, O., Herrmann, A., Packman, L.C., Bussow, K., Muller-Newen, G., Becker, W., 2004. Characterization of cyclin L2, a novel cyclin with an arginine/serine-rich domain: phosphorylation by Dyrk1A and colocalization with splicing factors. *J. Biol. Chem.* 279, 4612–4624.
- Dickson, D., 1999. Pick's disease. A modern approach. *Brain Pathol.* 8, 339–354.
- Duyckaerts, C., Dickson, D.W., 2003. Neuropathology of Alzheimer's disease. In: Dickson, D. (Ed.), *The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders*. ISN Neuropathol Press, Basel, pp. 47–65.
- Ferrer, I., Barrachina, M., Puig, B., 2002. Glycogen synthase kinase-3 is associated with neuronal and glial hyperphosphorylated *tau* deposits in Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Acta Neuropathol.* 104, 583–591.
- Ferrer, I., Barrachina, M., Tolnay, M., Rey, M.J., Vidal, N., Carmona, M.,

- Blanco, R., Puig, B., 2003. Phosphorylated protein kinases associated with neuronal and glial tau deposits in argyrophilic grain disease. *Brain Pathol.* 13, 62–78.
- Ferrer, I., Gómez-Isla, T., Puig, B., Freixes, M., Ribé, E., Dalfó, E., Avila, J., 2005. Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr. Alzh. Res.* 2, 3–18.
- Fotaki, V., Dierssen, M., Alcántara, S., Martínez, 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.
- 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. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1305–1310.
- Guimerá, J., Casas, C., Estivill, X., Pritchard, M., 1999. Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1A): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics* 57, 407–418.
- Gyure, K.A., Durham, R., Stewart, W.F., Smialek, J.E., Troncoso, J.C., 2001. Intraneuronal A β -amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 125, 489–492.
- Hammerle, B., Vera-Samper, E., Speicher, S., Arençibia, R., Martínez, 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.
- Hammerle, B., Carnicero, A., Elizalde, C., Ceron, J., Martínez, S., Tejedor, F.J., 2003a. Expression patterns and sub-cellular localization of the Down syndrome candidate protein MNB/DYRK1A suggest a role in late neuronal differentiation. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2277–2286.
- Hammerle, B., Elizalde, C., Galcerán, J., Becker, W., Tejedor, F.J., 2003b. The MNB/Dyrk1A protein kinase: neurobiological functions and Down syndrome implications. *J. Neural Transm.* 67, 129–137.
- Himpel, S., Panzer, P., Eirmbter, K., Czajkowska, H., Sayed, M., Packman, L.C., Blundell, T., Kentrup, H., Grotzinger, J., Joost, H.G., Becker, W., 2001. Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase Dyrk1A. *Biochem. J.* 359, 497–505.
- Kemper, T.L., 1991. Down syndrome. In: Peters, A., Jones, E.G. (Eds.), *Normal and Altered States of Function, Cerebral Cortex*, vol. 9. Plenum Press, New York, pp. 511–526.
- 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. *J. Biol. Chem.* 271, 3488–3495.
- Lee, M.V.Y., Goedert, M., Trojanowski, J.Q., 2001. Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1121–1159.
- Lim, F., Hernandez, F., Lucas, J.J., Gómez-Ramos, P., Morán, M.A., Ávila, J., 2001. FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and tau filaments in the forebrain. *Mol. Cell. Neurosci.* 18, 702–714.
- Mao, J., Maye, P., Kogerman, P., Tejedor, F.J., Toftgard, R., Xie, W., Wu, G., Wu, D., 2002. Regulation of Glil transcriptional activity in the nucleus by Dyrk1. *J. Biol. Chem.* 277, 35156–35161.
- 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 Res.* 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. *Neurobiol. Dis.* 15, 132–142.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Titani, K., Ihara, Y., 1995. Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J. Biol. Chem.* 270, 823–829.
- Okui, M., Ide, T., Morita, K., Kunakoski, 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.
- Pei, J.J., Braak, E., Braak, H., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Winblad, B., Cowburn, R.F., 1999. Distribution of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 β) for Alzheimer disease neurofibrillary tangle. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 1010–1119.
- Shindoh, N., Kudoh, J., Maeda, H., Yamaki, A., Minioshima, S., Shimizu, Y., Shimizu, N., 1996. Cloning of a human homologue of the *Drosophila* minibrain/rat Dyrk gene from “the Down syndrome critical region” of chromosome 21. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 92–99.
- Song, W.J., Sternberg, L.R., Kasten-Sportes, C., Keuren, M.L., Chung, S.H., Slack, A.C., Miller, D.E., Glover, T.W., Chaing, P.W., Lou, L., Kurnit, D.M., 1996. Isolation of human and murine homologues of the *Drosophila* minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome “critical region”. *Genomics* 38, 331–339.
- Song, W.J., Chung, S.H., Kurnit, D.M., 1997. The murine Dyrk protein maps to chromosome 16, localizes to the nucleus, and can form multimers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 640–644.
- 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.
- Torre, E., McNiven, M.A., Urrutia, R., 1994. Dynamin 1 antisense oligonucleotide treatment prevents neurite formation in cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 269, 32411–32417.
- 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 Res.* 1010, 69–80.
- Woods, Y.L., Cohen, P., Becker, W., Jakes, R., Goedert, M., Wang, X., Proud, C.G., 2001a. The kinase Dyrk phosphorylates protein synthesis initiation factor eIFBepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for Dyrk as a glycogen synthase kinase3-priming kinase. *Biochem. J.* 355, 609–615.
- Woods, Y.L., Rena, G., Morrice, N., Barthel, A., Becker, W., Guo, S., Unterman, T.G., Cohen, P., 2001b. The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site. *Biochem. J.* 355, 597–607.
- Yang, E.J., Ahn, Y.S., Chung, K.C., 2001. Protein kinase Dyrk1 activates cAMP response element-binding protein during neuronal differentiation in hippocampal progenitor cells. *J. Biol. Chem.* 276, 39819–39824.

On dendrites in Down syndrome and DS murine models: a spiny way to learn

R. Benavides-Piccione^{a,1}, I. Ballesteros-Yáñez^{a,1}, M. Martínez de Lagrán^{b,2},
G. Elston^{c,3}, X. Estivill^{b,2}, C. Fillat^{b,2}, J. DeFelipe^{a,1}, M. Dierssen^{b,2,*}

^aCajal Institute, 28002 Madrid, Spain

^bProgram in Genes and Disease, Genomic Regulation Center, 08003 Barcelona, Spain

^cVision, Touch and Hearing Research Centre, School of Biomedical Sciences, Queensland Brain Institute,
The University of Queensland, 4072, Australia

Received 11 March 2004; accepted 2 August 2004

Abstract

Since the discovery in the 1970s that dendritic abnormalities in cortical pyramidal neurons are the most consistent pathologic correlate of mental retardation, research has focused on how dendritic alterations are related to reduced intellectual ability. Due in part to obvious ethical problems and in part to the lack of fruitful methods to study neuronal circuitry in the human cortex, there is little data about the microanatomical contribution to mental retardation. The recent identification of the genetic bases of some mental retardation associated alterations, coupled with the technology to create transgenic animal models and the introduction of powerful sophisticated tools in the field of microanatomy, has led to a growth in the studies of the alterations of pyramidal cell morphology in these disorders. Studies of individuals with Down syndrome, the most frequent genetic disorder leading to mental retardation, allow the analysis of the relationships between cognition, genotype and brain microanatomy. In Down syndrome the crucial question is to define the mechanisms by which an excess of normal gene products, in interaction with the environment, directs and constrains neural maturation, and how this abnormal development translates into cognition and behaviour. In the present article we discuss mainly Down syndrome-associated dendritic abnormalities and plasticity and the role of animal models in these studies. We believe that through the further development of such approaches, the study of the microanatomical substrates of mental retardation will contribute significantly to our understanding of the mechanisms underlying human brain disorders associated with mental retardation.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	112
2. Dendritic pathology in Down syndrome	112
2.1. How do dendritic arbourisations develop in Down syndrome brains?	113
2.2. Genetic control of dendritic maturation: what is wrong in Down syndrome?	114

Abbreviations: DS, Down syndrome; SIM2, single-minded homolog 2; DYRK1A, dual-specificity tyrosine-Y-phosphorylation kinase; GART, phosphoribosylglycinamideformyltransferase; PCP4, Purkinje cell protein 4; DSCAM, Down syndrome cell adhesion molecule; APP, amyloid beta A4 precursor; S100B, calcium binding protein beta; SOD1, superoxide dismutase 1; DSCR1, Down syndrome critical region 1; ITSN, intersectin

* Corresponding author. Tel.: +34 93 224 0900; fax: +34 93 224 0899.

E-mail address: g.elston@vthre.uq.edu.au (G. Elston), defelipe@cajal.csic.es (J. DeFelipe), mara.dierssen@crg.es (M. Dierssen).

¹ Tel.: +34 91 585 4735; fax: +34 91 585 4754.

² Tel.: +34 93 224 0900; fax: +34 93 224 0899.

³ Tel.: +61 7 33654108; fax: +67 7 33654522.

3. The neural phenotype in animal models for Down syndrome: what do we know?	116
4. Pharmacological and non-pharmacological strategies targeting cognitive functions treatments: can we change Down syndrome brains?	119
4.1. Drugs to improve cognition	119
4.2. Non-pharmacological strategies	120
5. Conclusions.	121
Acknowledgements	122
References	122

1. Introduction

The biological bases for mental retardation are poorly understood, but defects in neuronal network formation or in properties of brain plasticity likely contribute to the cognitive impairment. Down syndrome (DS) is the most common genetic disorder associated with mental retardation (Hassold and Jacobs, 1984; Mastroiacovo, 2002) and its phenotypic characteristics are believed to stem from the overexpression of a set of genes on human chromosome 21. Thus, studies of the DS population provide a rare opportunity to examine relationships between cognition, genotype and brain neurobiology. In patients with DS, mental retardation is moderate and the intelligence coefficient ranges between 20 and 80 (Anneren and Pueschel, 1996). The rate of cognitive development tends to slow as children with DS grow older so that the brain undergoes a progressive postnatal degenerative process.

The neuropathological correlates of these impairments are still under intensive investigation. In subjects with DS, brain size and weight are moderately reduced at birth. Specific brain areas exhibit an immature gyral pattern, neocortical laminar formation is irregular and myelination of cortical fibres is delayed (Kemper, 1988; Golden and Hyman, 1994; Wisniewski and Kida, 1994). Data obtained from studies that have utilized functional neuroimaging techniques have expanded our knowledge of the neuroanatomical basis of brain malfunctioning in DS brains and provided initial clues as to the specific defects that occur during neural development. The advent of *in vivo* structural brain imaging will not only help researchers identify which brain structures are implicated in specific neurobehavioural conditions but also may discover individual variations among persons with the same genetic defect. Using magnetic resonance imaging (MRI), Raz et al. (1995) showed that young adult DS subjects have reduced volumes of cerebral and cerebellar hemispheres, ventral pons, mammillary bodies, and hippocampal formation, even after adjustment for body size. In contrast, the parahippocampal gyrus is enlarged and frontal lobe volumes are disproportionately smaller in DS (Pinter et al., 2001). Functional imaging with positron emission tomography (PET) shows

cerebral metabolic rates for glucose in young DS adults, with fewer significant correlations in different brain regions than in controls, suggesting that functional connections between brain circuit elements are reduced leading to dysfunctional circuitry in adults (Shapiro et al., 1992).

At the microscopic level, neuronal density is decreased in distinct regions of DS brains, including the cochlear nuclei, cerebellum, hippocampus, basal forebrain, the granular layers of the neocortex and areas of the brainstem. In the neocortex, neuronal morphology is abnormal and neuronal orientation is aberrant (reviewed in Flórez, 1992). Other studies have reported reductions in cortical width, abnormal cortical lamination patterns, altered dendritic arbours and dendritic spines, aberrant electrophysiological properties of membranes, reduced synaptic density and abnormal synaptic morphology in DS fetuses (Becker et al., 1986, 1991; Marin-Padilla, 1976; Suetsugu and Mehraein, 1980, see also Section 1.1). Some of these alterations may be related to an abnormal development of the nervous system during pre- and post-natal life. However, it is difficult to attribute the cognitive alterations in DS to a simple reduction of brain size or neuronal density. In fact, neuronal cell structure does not correlate with differences in brain size. Instead, different aspects of neuronal cell structure such as the size of the basal dendritic arbours, their branching structure, and spine density may vary independently (see Elston, 2003a for a review).

2. Dendritic pathology in Down syndrome

Neural mechanisms underlying mental retardation may include defects in the formation of neuronal networks and/or in information processing aspects of brain plasticity. Dendritic *pathology* is a consistent feature and substrate of mental retardation across multiple conditions suggesting that dendritic abnormalities are an index of major neuronal disruption (reviewed in Kaufmann and Moser, 2000) and that dendritic architecture determines the nature of a neurone's inputs and its role in cortical circuitry (Friedlander et al., 1982; Bacon and Murphey, 1984). In DS, the pathogenesis of dendritic abnormalities is distinctive and appears to correlate to some extent with cognitive profile.

Both abnormal postnatal development, and remodelling of the brain circuitry could contribute to observed dendritic abnormalities in DS, with serious consequences on the cognitive abilities. However, if the severity and extent of dendritic alterations correlates with cognitive function, then DS subjects with moderate mental retardation should show mild dendritic abnormalities; likewise, if dendritic abnormalities are a sign of global cognitive dysfunction, they should be observed in many other syndromes associated with mental retardation, and dendritic alterations should parallel defects in neuronal maturation and/or decline in cognition. Moreover, these alterations may depend on different cellular mechanisms so that in DS, neurons may not achieve the structural complexity observed in normal children, or alternatively they may undergo greater dendritic retraction during maturation. Good candidate genes exist on chromosome 21, whose altered function could account for both possibilities (see the following).

2.1. *How do dendritic arborisations develop in Down syndrome brains?*

It has been argued that DS persons start their lives with an apparently normal neuronal architecture that progressively degenerates. Thus, normal or even increased branching in the DS foetus and newborn contrasts with reduced dendrites and degenerative changes in older children with DS. Becker et al. (1986) showed that in infants with DS younger than 6 months, dendritic branching and length in both apical and basilar dendrites were greater than in normal infants. During the peak period of dendritic growth and differentiation, quantitative analysis of dendrites in layer IIIc pyramidal neurons of prefrontal cortex (prospective area 9) of the brains of 2.5-month-old infants revealed no significant differences in dendritic differentiation between euploid and DS cases (Vuksic et al., 2002). In contrast, basilar dendrites of cortical pyramidal neurons are shorter than normal in DS subjects older than 4 months (Takashima et al., 1981). These findings suggest that children with DS begin their lives with morphologically normal layer III pyramidal neurons and that pathologic changes in key prefrontal input–output neuronal elements occur after 2.5 months of postnatal age. Subsequent to this age, there is a steady decrease so that in subjects with DS older than 2 years, these parameters are reduced relative to controls especially in apical dendrites (Becker et al., 1986).

In adults with DS, cross-sectional studies demonstrate marked reductions in dendritic branching and length, and in spine density (Takashima et al., 1989; Becker et al., 1991). Degenerative neuronal changes are also associated with dendritic abnormalities. Two other reports on pyramidal neurons in parietal cortex (Schulz and Scholz, 1992) and on non-pyramidal neurons in motor cortex (Prinz et al., 1997) support these findings. In cases of aged DS brains that do not show Alzheimer disease (AD)-like pathology, the number of spines in the middle and distal segments of apical dendrites

of pyramidal neurons in cingulate cortex and in hippocampus are reduced; these changes are more severe in CA1 of those DS cases with AD (Suetsugu and Mehraein, 1980; Ferrer and Guillotta, 1990).

Reductions in the size and dendritic length of pyramidal cells also affect the total number of spines (Fig. 1). Dendritic spines are thin protrusions emerging from dendrites that are the sites of most excitatory synapses in the cerebral cortex. Spines are believed to increase the connectivity of neurons, to provide chemical compartmentalisation for calcium and proteins, and to participate in neural computation (Sorra and Harris, 2000). Recent studies show that dynamic changes in the structure and shape of spines are important for synaptic function (Harris, 1999; Yuste and Bonhoeffer, 2001). Since each spine receives at least one excitatory glutamatergic synapse (reviewed in DeFelipe and Fariñas, 1992; Elston and DeFelipe, 2002), decreases in spine density and number may impair the ability of pyramidal neurons to integrate inputs, and reveal an impaired activity-dependent neural plasticity. The size and branching pattern in the dendritic arbours of pyramidal neurons relate to a number of physiological and biochemical properties of these cells including (1) compartmentalisation of processing of cortical neurons, and (2) synaptic plasticity, a process that refers to the changes in the strength of synaptic function, and includes both short-term changes in the strength or efficacy of neurotransmission as well as longer term changes in the structure and number of synapses (for a review see Elston et al., 2001). Thus, changes in the number of spines in the dendritic arbours of neurons may influence both cellular and systems cortical function (see Elston and DeFelipe, 2002; Elston, 2003b; Jacobs and Scheibel, 2002, for reviews).

Dendritic spines are heterogeneous with regard to their structure, stability and function (see Kasai et al., 2003; Benavides-Piccione et al., 2004). Spines with large heads are stable, express large numbers of AMPA-type glutamate receptors, and contribute to strong synaptic connections. In contrast, spines with small heads are motile and unstable and contribute to weak or silent synaptic connections. These structure–stability–function relationships suggest that large and small spines are ‘memory spines’ and ‘learning spines’, respectively (Kasai et al., 2003). Glutamate receptors turnover rapidly, indicating that spine structure and the underlying organisation of the actin cytoskeleton are likely major determinants of fast synaptic transmission and provide a physical basis for memory in cortical neuronal networks. Interestingly, initial studies of infants with DS demonstrated that spines are sparse, small and had short stalks intermingled with unusually long spines in motor cortex (Marin-Padilla, 1972, 1976; Purpura, 1974). The decreased density and long and tortuous profile of spines from DS brains are typical features of spine dysgenesis (Marin-Padilla, 1972). In DS, spine dysgenesis is associated with dendritic vacuolisation and neuronal necrosis (Marin-Padilla, 1976). Therefore, dendritic spine dysgenesis in DS may indicate an early postnatal degenerative process. Takashima et al. (1981) also

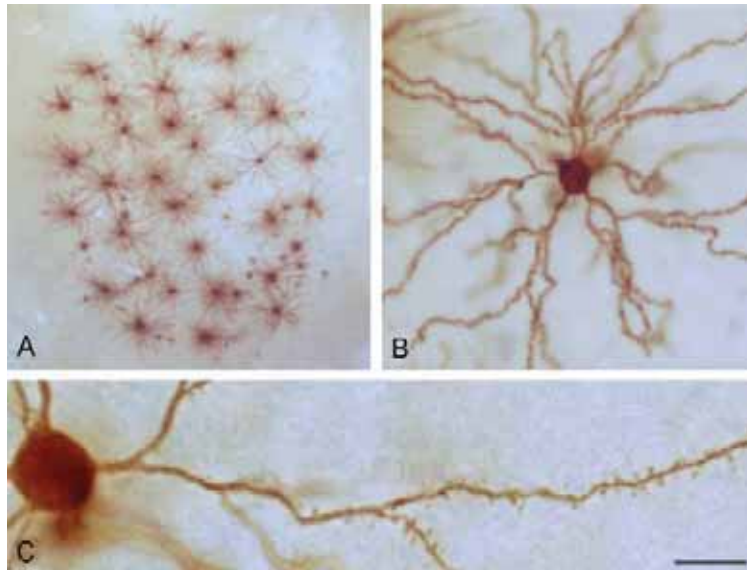


Fig. 1. (A) Low-power photomicrograph of layer III pyramidal cells in a 150- μm thick slice taken from the frontal cortex of a wild type mouse that were injected with Lucifer Yellow and processed for a light-stable diaminobenzidine reaction product. (B) Higher magnification showing layer III pyramidal cells of the frontal cortex. (C) High power photo of a horizontally projecting dendrite to illustrate the density and distribution of individual dendritic spines along its length. Note the clear detail of individual dendritic spines. Scale bar: 400 μm in (A), 60 μm in (B), and 10 μm in (C).

raised this possibility in one of the largest studies with respect to sample size that analysed neurons of the visual cortex in foetuses, neonates and infants with DS.

In view of these reports it is likely that the dendritic alterations in DS are the result of deficits in neurodevelopment. Dendritic development is a sequential process in which generation, elongation, and retraction of dendritic branches and spines are the result of the interactions between intrinsic genetic programs and external modulators (e.g., neurotransmitters) (see Kaufmann, 1999; Weitzdoerfer et al., 2001). Dendritic growth initially follows genetic dictates but later becomes modified by levels and patterns of activity (Bartlett and Banker, 1984) in both developing (Kossel et al., 1995; Segal, 1995) and mature systems in response to numerous manipulations, including denervation (Parnavelas et al., 1974), long-term potentiation (LTP) (Buchs and Muller, 1996; Sorra and Harris, 1998), and environmental stimulation (Comery et al., 1996; Jones et al., 1997). With each developmental stage, the expression of a set of dendritic proteins (Petit et al., 1988; Kaufmann et al., 1997), neurotransmitters and growth factors that influence the progression of dendritic development changes. Spines are very dynamic structures; their size, shape and number change throughout life. During development, dendritic protrusions start out as filopodia, which search out contacts with synaptic terminals and then mature into adult spines (Ziv and Smith, 1996). In adults, modulation of the number and shape of spines is associated with synaptic plasticity (Engert and Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999; Lendvai et al., 2000; Toni et al., 1999) and learning (Comery

et al., 1996). Spine abnormalities and changes in the numbers of spines in the dendritic arbours of neurons are commonly reported in neurological disorders such as mental retardation (Purpura, 1974; Geinisman et al., 1992; Dierssen et al., 2003). In DS, pyramidal neurons are morphologically normal at birth, but the number of dendrites and spines decrease steadily in postnatal life. Thus, the genetic defect associated with dendritic disturbances in DS may disrupt signalling pathways and/or modulators of dendritic development (Table 1, see also Section 1.2).

Changes in synaptic function and remodelling of synaptic networks induced by specific patterns of activity are believed to represent key mechanisms for information processing (Stepanyants et al., 2002). Thus, the identification and functional analyses of the gene products involved in DS are critical not only for a better understanding of the causes of mental retardation but also for identifying the cellular and molecular mechanisms contributing to cognitive function.

2.2. Genetic control of dendritic maturation: what is wrong in Down syndrome?

Dendritic alterations in DS may be the consequence of higher levels of proteins coded for by three copies of genes on human chromosome 21 (Table 1). Specific genetic loci, especially those in the DS critical region (DSCR), are primary candidates for regulating the abnormal development and maturation of the DS brain (Delabar et al., 1993; Shapiro, 1999). However, genes located on other chromosomes are also involved. The enormous amount of new

Table 1
HSA21 genes involved in brain development and synaptic plasticity

SIM2 (single-minded homolog 2)	Synchronized cell division and establishment of (<i>Drosophila</i>) proper cell lineage
DYRK1A (dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation kinase)	Expressed during neuroblast proliferation and believed to regulate of cell-cycle kinetics. Possible role in neurogenesis and neural plasticity
GART (phosphoribosylglycinamide formyltransferase)	Expressed during prenatal development of the cerebellum
PCP4 (Purkinje cell protein 4)	Expressed exclusively in the brain most abundantly in the cerebellum
DSCAM (Down syndrome cell adhesion molecule)	Role in axonal outgrowth
GRIK1 (glutamate receptor)	Expressed in pyramidal cells of the cortex in fetal and early postnatal life and in adult
APP (amyloid beta (A4) precursor)	Involved in plasticity, neurite outgrowth, and Alzheimer disease
S100B (neural) (S100 calcium binding protein beta)	Stimulates glial proliferation
SOD1 (superoxide dismutase 1)	Role in apoptosis in fetal DS neural cultures
DSCR1 (Down syndrome critical region 1)	Role in LTP/LTD
ITSN (intersectin)	Role in endocytosis

molecular and biological data that has developed for human chromosome 21 as a result of the human genome initiative (Hattori et al., 2000a,b) has sped up the understanding of the molecular and cellular basis of mental retardation, and will have an immediate impact on the study of the genetic aspects of DS by providing a comprehensive catalogue of the genes on human chromosome 21. The gene content of chromosome 21 is now estimated to be 329, including 165 experimentally confirmed genes, 150 gene models based on expressed sequence tag databases and 14 computer predictions (see <http://www-eri.uchsc.edu>). Several anonymous loci for monogenic disorders and predispositions for common complex disorders have also been mapped to human chromosome 21. However, the functions of most of these genes remain largely unknown, as does their contribution, if any, to DS. The phenotypic consequences of increased gene dosage depend, in part, on the biological function of the gene product itself (e.g., enzyme, structural protein, transcription factor, intracellular signalling molecule, cell surface marker, receptor subunit, etc.). To date, only a few human chromosome 21 encoded genes have been used to make transgenic mice (see Dierksen et al., 1999, 2001, 2003; Pritchard and Kola, 1999 for reviews).

The selection of candidate genes is based on their location in the chromosomal region that is considered critical for the development of the syndrome, the previous knowledge of the functions of the proteins that they encode, or their spatio-temporal pattern of expression. The recent creation of a high-resolution expression 'atlas' of human chromosome 21 is facilitating the understanding of gene function and of the pathogenetic mechanisms in Down syndrome (Gitton et al., 2002; Reymond et al., 2002). The spatial and temporal expression patterns must be linked to structural and physiological changes, information that will shed light on the roles of individual genes in specific developmental pathways.

Multiple molecular cascades are likely to be involved in normal dendritic and spine maturation (see Elston and DeFelipe, 2002; Harris, 1999; Horner, 1993; Shepherd, 1996 for reviews). Here we focus on some of what we consider to be the most salient molecular mechanisms that may be

altered in DS individuals, resulting in specific DS associated neuropathology. *DYRK1A*, is a serin-threonin kinase located on HSA21, has been reported to influence neurogenesis and dendritic development. Yang et al. (2001) showed that overexpression of a kinase-deficient form of *DYRK1A* attenuates the neurite outgrowth induced by a neurogenic factor in immortalized hippocampal cells. In addition, the expression pattern of *Dyrk1A* mRNA and protein at early embryonic ages in mice suggests that it participates in the transition of neuroepithelial cells from proliferating to neurogenic divisions (Hammerle et al., 2002). *Dyrk1A* also regulates the development of dendritic trees of neurones and modulates the activity of the c-AMP response element-binding protein (CREB), which participates in signal transduction pathways involved in synaptic plasticity and neuronal differentiation (Hammerle et al., 2003). Finally, DYRK kinases may modulate dendrite development by regulating vesicle trafficking which is dependent on Dynamin (DYN1), a GTPase putative substrate of DYRK1A, that plays a fundamental role in synaptic vesicle recycling, clathrin-mediated endocytosis, intracellular membrane trafficking (see Torre et al., 1994 for a review) and neurite outgrowth (Chen-Hwang et al., 2002; Kim et al., 1997). DYRK1A is transported through the growing dendritic tree where it co-localizes with DYN1 (Hammerle et al., 2003). Taken together these data suggest a relevant function for *Dyrk1A* during neuronal development, related to proliferation and differentiation. Interestingly, reduced *Dyrk1A* dosage in mice leads to a decrease in brain size, with no obvious alterations in the lamination and anatomy of the cerebral cortex (Fotaki et al., 2002). In *Dyrk1A* haplo-insufficient mice, neuropil size is decreased in some brain areas. In particular, pyramidal cells in *Dyrk1A*^{+/-} layer III are considerably smaller, less branched and less spinous than those in wild type animals, suggesting that *Dyrk1A* is involved in the determination of the pyramidal cell phenotype and circuit structure (Benavides-Piccione et al., submitted).

Down syndrome cell adhesion molecule (DSCAM) is overexpressed in DS brains. The mechanism by which DSCAM is involved in the pathogenesis of mental

retardation is by its inhibitory action on synaptogenesis and neurite outgrowth. A lethal mutation in the *Drosophila Dscam* specifically perturbs segregation of axonal branches (Wang et al., 2002). How does the mutation differ from excess expression of this protein? Axon bifurcation is essential for efficient innervation of multiple targets and results in the formation and divergent segregation of the sister branches.

Amyloid deposition in the form of the A β peptide is detected as early as at 21 gestational weeks in DS (Teller et al., 1996), which coincides with normal initial cortical dendritic growth (Huttenlocher, 1990). Inflammatory responses associated with A β deposition in senile plaques in AD include production of cytokines (Dickson, 1997), which may operate as negative modulators of dendritic growth and maintenance in DS.

Finally, dendritic spines are extremely motile, providing a structural mechanism for synaptic plasticity (Crick, 1982). As the major cytoskeletal components in dendritic spines, actin filaments provide the basic structural scaffolding of spines (Hayashi et al., 1996; Penzes et al., 2003) and are likely responsible for the changes in the shape of spines. Among actin-regulatory components of spines, drebrin is co-localized with actin filaments at dendritic spines in high-density long-term primary cultures of rat cerebral cortex neurons. Drebrin, an actin-binding protein, is thought to regulate assembly and disassembly of actin filaments (Asada et al., 1994), thereby changing the shape of spines. In fact, when the actin-binding domain of drebrin is deleted, the protein distributes in both spines and dendritic shafts, indicating that the selective accumulation of drebrin in the spines requires its actin-binding activity (Hayashi and Shirao, 1999). In the early second trimester, levels of drebrin and the synaptosomal associated proteins alpha SNAP and SNAP 25 are lower in DS brains (Shim and Lubec, 2002). Thus, spine motility and plasticity may be affected in DS brains. Other genes that may be involved in central nervous system development or neural functions related to synaptic plasticity are listed in Table 1.

3. The neural phenotype in animal models for Down syndrome: what do we know?

A better understanding of DS neuronal networks will enhance the understanding of cognitive processes, and to achieve this goal animal models have enormous potential to elucidate mental retardation mechanisms that may be acting in humans. Studies with the various trisomy mouse models at different developmental stages can recreate certain conditions that result in abnormal learning capabilities in DS. Experimental models for human disease have greatly advanced our knowledge of basic brain mechanisms, psychiatric conditions and neurological diseases. The use of transgenic techniques to model human disease has led to

major advances in our understanding of pathogenic mechanisms, but has also highlighted the limitations of conventional transgenic methodology for the production of accurate animal models, and the difficulties associated with modelling human pathophysiology in mice (Gerlai, 1996; Crawley and Paylor, 1997; Rogers et al., 1997). We have to bear in mind the limitations of conventional transgenic methodology: the presence of compensatory processes (up- or downregulation of gene products) and resulting secondary phenotypical changes, the fact that null-mutant organism might not only lack the product of a single gene but might also possess a number of developmental, physiological, or even behavioural processes that have been altered to compensate for the effect of the null mutation, and the presence of an array of complex phenotypical changes that might not be directly related to the function of the gene of interest.

The varied approaches used to study the consequences of increased gene dosage in DS and to investigate phenotype/genotype relationships of HSA21 genes in mice (see Cairns, 2001; Galdzicki and Siarey, 2003 for review) are: (1) transgenic animals overexpressing single or combinations of genes, (2) transgenic mice with large foreign DNA pieces introduced on yeast artificial chromosomes (YACs) or bacterial artificial chromosomes into mice (Smith et al., 1995, 1997), (3) mouse models that carry all or part of MMU16, which has regions of conserved homology with HSA21 and (4) chimaeric mice that carry a fragment of human chromosome 21 (Tomizuka et al., 1997).

Single gene transgenesis has been used as a tool to understand the molecular basis of DS. Although overexpressing a single gene will not be a model of DS, the value of single gene transgenesis is to identify genes related to specific pathophysiological features. Studying transgenic mice that overexpress single genes, either with their own genomic regions for gene regulation and expression, or with heterologous promoter sequences that drive the expression of the genes in specific tissues, allows the determination of the contribution of each gene to the phenotype.

The interest in trisomic models lies in modelling and characterizing DS (or a part of it) and in testing therapeutic strategies. Trisomy models have the advantage in that they overexpress orthologues of multiple genes located on HSA21, permitting the study of how multiple genes interact to control each other at the level of transcription. Orthologous genes are frequently linked in similarly conserved chromosomal segments in the mouse and human genomes (Mouse Genome Database: <http://www.informatics.jax.org>). For this reason aneuploidy for regions of the mouse genome that are conserved on human chromosomes allows for the study of the effects of over (or under) expression of multiple genes. HSA21 shows conserved synteny to mouse chromosomes (MMU) 16, 17 and 10 (Hattori et al., 2000a,b). Comparative mapping between mice and humans shows that HSA21 shares a large region of genetic homology with MMU16. Based on this rationale,

mice trisomic for MMU16 has been extensively used as a model for DS. The first mice used had three copies of the complete MMU16 (Ts16 mice). Ts16 mice exhibit some characteristics of DS (Miyabara et al., 1984; Gearhart et al., 1986). However, Ts16 mice die in utero precluding the study of many of the major features that occur postnatally (e.g., mental retardation, Alzheimer's disease neuropathology). In addition, only 129 of the 731 genes on MMU16 correspond to HSA21, and thus Ts16 mice are not trisomic for some HSA21 genes and have three copies of other genes that are not implicated in the pathogenesis of DS. In spite of all these shortcomings, Ts16 mice do model some of the characteristic features of DS. These features include: (1) cardiac malformations, which are associated with the Down syndrome critical region 1 (DSCR1) gene, encoding a regulatory protein in the calcineurin/NFAT signal transduction pathway (Lange et al., 2004), (2) craniofacial and ocular malformations including a reduction of periorbital connective tissue and micro-ophtalmia (Oster-Granite, 1986) and alterations in the development of the cerebellum, hippocampus and cortical plate (Grausz et al., 1991). The overall reduction in cortical neurons in TS16 is thought to arise from abnormalities in neurogenesis, a failure of brain-derived neurotrophic factor-dependent neuron survival and increased caspase-dependent apoptosis (Haydar et al., 1996, 2000; Bambrick and Krueger, 1999; Dorsey et al., 2002). Mouse Ts16 hippocampal neurons demonstrate slowed depolarisation of the AP, reflecting a reduced TTX-sensitive voltage-dependent Na^+ current and a reduced density of Na^+ channels. The dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca^{2+} current is increased, reflecting an increased density of L-type Ca^{2+} channels. Abnormal Na^+ and Ca^{2+} channel densities are not due to reduced transcription of the main channel subunits and thus likely reflect post-translational defects. The abnormalities in Ts16 hippocampal neurons are opposite in direction to abnormalities in Ts16 DRG neurons, indicating that there is not a common membrane electrical abnormality in all Ts16 neuronal types. The cell-type differences may reflect, however, a common defect in signal transduction possibly involving channel phosphorylation (see Galdzicki and Siarey, 2003). Selective failure of BDNF-dependent survival in cultured hippocampal neurons from the Ts16 mouse has been described. This failure is accompanied by overexpression of a truncated, kinase-deficient isoform of the BDNF receptor tyrosine receptor kinase B (NTRK2). Adenovirus-mediated introduction of exogenous full-length NTRK2 into Ts16 neurons fully restored BDNF-dependent survival, whereas exogenous truncated NTRK2 expression in normal, euploid neurons reproduced the Ts16 BDNF signalling failure. Thus, the failure of Ts16 neurons to respond to BDNF is caused by dysregulation of NTRK2 isoform expression. Such a neurotrophin signalling defect could contribute to altered late LTP, thus leading to altered structural properties of the dendritic spines with consequences in neural plasticity and possibly in long-term memory storage.

The Ts16 mice present altered corticogenesis (Haydar et al., 1996). Slowed tangential expansion of the neuroepithelium in Ts16 resulted in a reduction of final telencephalic size and is predicted to decrease the number of radial cortical units in the mature brain. In addition, radial growth of the Ts16 cortex was delayed probably due to a defective cortical neurogenesis, since the number of neocortical founder cells is reduced by 26% in Ts16 mice, leading to a reduction in overall cortical size at the end of Ts16 neurogenesis (Haydar et al., 2000). Thus, altered proliferative characteristics during Ts16 neurogenesis result in a delay in the generation of neocortical neurons, whereas the founder cell deficit leads to a proportional reduction in the overall number of neurons. Such prenatal perturbations in either the timing of neuron generation or the final number of neurons produced may lead to significant neocortical abnormalities such as those found in DS (Haydar et al., 1996, 2000).

More recently three partial trisomic mice of MMU16 became available (see Gardiner et al., 2003 for review): Ts65Dn mice (Davisson et al., 1990) contain three copies of MMU16 from *App* to *Mxl*; Ts1Cje mice have three copies from *Sod1* to *Mxl* and Ms1Ts65 (Sago et al., 1998) *App* to *Sod1*. The generation by Davisson et al. (1990) of a partial trisomy 16 mouse, the Ts (17^{16}) 65Dn or Ts65Dn model, that includes most of the MMU16 region homologous to HSA21 (from *App* to *Mxl*) but which lacks the remaining approximately 40% of HSA21 genes (Akeson et al., 2001) has led to a major advance in DS research. Although many genes overexpressed in Ts65Dn are homologous to those included in the DSCR, these mice do not show some of the gross abnormalities frequently observed in DS, such as cardiac valvular congenital abnormalities (Montero et al., 1996). However, Ts65Dn mice exhibit analogous effects on craniofacial structures and cognitive deficits (Escorihuela et al., 1995, 1998; Richtsmeier et al., 2000; Holtzman et al., 1996; Hyde and Crnic, 2002; Hunter et al., 2003; Wenger et al., 2004). In terms of behaviour, the Ts65Dn mice show deficits in reference and working memory that correlate with frontal cortex BDNF levels (Bimonte-Nelson et al., 2003), hyperactivity, reduced attention levels (Escorihuela et al., 1995, 1998; Reeves et al., 1995; Coussons-Read and Crnic, 1996; Holtzman et al., 1996; Hyde et al., 2001), and reduced responsiveness to nociceptive stimuli (Martínez-Cué et al., 1999). Although brain size and histology appear normal in Ts65Dn mice, significant alterations have been reported; high-resolution magnetic resonance imaging and histological analysis reveal neuroanatomical parallels between DS and Ts65Dn cerebellum (Baxter et al., 2000). Cerebellar volume is decreased in Ts65Dn mice due to reductions in both the internal granule layer and the molecular layer. Granule cell number also is decreased. The cerebellar dysmorphology in the Ts65Dn mouse parallels that of DS individuals, and may be related to the global disruption of the cerebellar transcriptome (Saran et al., 2003). In addition, stereological morphometric studies demonstrate minor

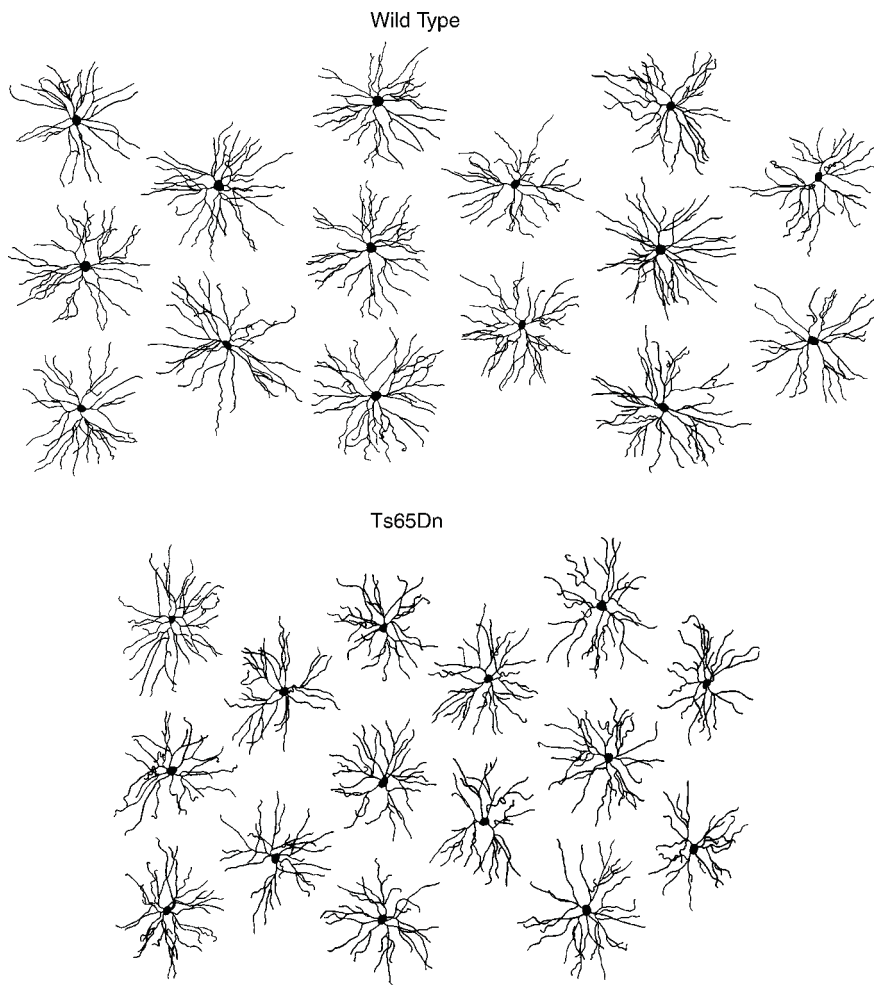


Fig. 2. Camera lucida drawings of layer III pyramidal neurons, as seen in the plane of section parallel to the cortical surface, sampled from wild type and Ts65Dn^{+/+} mice. Illustrated cells have basal dendritic arbours that approximated the average size in each of the groups. Scale bar = 150 μ m.

irregularities in selected regions of the hippocampus of Ts65Dn mice, including reductions in the volume of CA2 and in neuronal density in the dentate gyrus (Insausti et al., 1998).

Of particular interest is the structure of pyramidal cells, the most ubiquitous neuron in the neocortex. Using intracellular injections with Lucifer Yellow to visualize the whole basal dendritic tree, we find that pyramidal cells are smaller, less branched and 24% less spinous in Ts65Dn mice than those in controls (Fig. 2). These effects on pyramidal cell structure parallel those obtained in humans (see Section 2). The similarity of the structural changes in the Ts65Dn mice to those in DS, indicate that this model will provide a means by which to study brain pathology in DS not possible in humans (see Section 2). More specifically, the Ts65Dn mouse provides a vehicle in which to study the

microanatomical substrate of mental retardation in DS, and develop new treatment strategies.

Our group has combined dendritic labelling and synapse analysis in Ts65Dn mice. At old ages, the temporal cortex of Ts65Dn mice has a significantly lower number (30%) of asymmetric (presumptive excitatory) synapses while the number of symmetric (presumptive inhibitory) synapses is not different than controls (Kurt et al., 2000). However, the mean synaptic apposition lengths of both asymmetric and symmetric synapses were significantly larger in Ts65Dn mice (15 and 11%, respectively), suggesting that excitatory synapses are preferentially affected in Ts65Dn mice and that there is an attempt to compensate for the deficit of asymmetric synapses by increasing the contact zone area of existing synapses. Neurochemical studies have revealed abnormal patterns in signalling pathways involved in

activity-dependent synaptic stabilisation and dendrite growth. Adenyl cyclase and phospholipase C signalling pathways are also severely disturbed in the brain of Ts65Dn mice and patients with DS (Dierssen et al., 1996, 1997; Ruiz de Azua et al., 2001). These alterations may lead to functional abnormalities in the central nervous system since both basal and stimulated production of cyclic AMP (cAMP) are reduced in Ts65Dn mice.

In addition, studies investigating alterations of neurotransmitters, synaptic ultrastructure, and long-term potentiation demonstrate severe deficits in the limbic system of Ts65Dn mice (Siarey et al., 1997). Behavioural studies confirm deficiencies observed at a molecular level, showing that Ts65Dn mice perform poorly on tasks requiring spatial memory, including the Morris maze, the land version of the radial-arm maze (RAM), and context discrimination tasks.

The results of studies of cultured neurons from human fetuses with DS and from fetuses of animal models for DS suggest that the malfunctioning of brain circuits in the DS brain may arise from abnormal neuronal electrical and biochemical properties, since long-term memory storage depends on morphological and biochemical changes associated with experience-dependent plasticity of neuronal synapses. Changes in spine number and morphology reflect mechanisms for converting transient changes in synaptic activity into long-lasting memory. In Ts65Dn mice, abnormalities in the duration of the action potential and its rates of depolarisation and repolarisation, altered kinetics of active Na^+ , Ca^{2+} and K^+ currents, and altered membrane densities of Na^+ and Ca^{2+} channels have been observed (see Galdzicki and Siarey, 2003 for review). Furthermore, electrophysiological studies of the CA1 region of the hippocampus from the adult Ts65Dn mouse show synaptic plasticity changes that lead to abnormalities in LTP and LTD, models of learning and memory (Siarey et al., 1999; Galdzicki and Siarey, 2003).

Ts1Cje is another partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome that exhibits learning and behavioural abnormalities (Sago et al., 1998). The Ts1Cje mouse contains a translocated chromosome 16, and is at dosage imbalance for 67% of the genes triplicated in Ts65Dn. It has been attempted to assess the phenotypic contribution of the region of difference between Ts65Dn, Ts1Cje, and a new segmental trisomic (Ms1Ts65) for the region of difference (APP to Sod1) by generating these models as littermates and testing them in parallel. Whereas triplication of Sod1 to Mx1 plays the major role in causing the abnormalities of Ts65Dn in the Morris water maze, imbalance of APP to Sod1 also contributes to the poor performance, so that although the performance of Ts1Cje mice was similar to that of Ts65Dn mice, Ts65Dn was more severely affected in the reverse probe tests. By contrast, the deficits of Ms1Ts65 mice were significantly less severe than those of Ts65Dn (Sago et al., 2000). However, although this first report indicated a dosage-imbalance effect in learning and memory, subse-

quent work on other phenotypes gave rise to contradictory results. Trisomic mice have cerebellar pathology with direct parallels to DS. When studying the cerebellar phenotypes in detail, by comparing the three available trisomic models, cerebellar volume was significantly affected to the same degree in Ts1Cje and Ts65Dn, despite that Ts1Cje has fewer triplicated genes. However, dosage imbalance in Ts1Cje had little effect on granule cell and Purkinje cell density. Several mice with dosage imbalance for the segment of the Ts65Dn chromosome not triplicated in Ts1Cje had phenotypes that contrasted with those in Ts1Cje (Olson et al., 2004). These observations point to specific gene action in DS more than a general dosage-imbalance effect.

4. Pharmacological and non-pharmacological strategies targeting cognitive functions treatments: can we change Down syndrome brains?

4.1. Drugs to improve cognition

Over the years a wide range of therapies to improve cognition in persons with DS have been studied. At present, there is no proven pharmacological treatment for the cognitive or language impairments in DS. Different strategies for the treatment of cognitive deficits in DS have been employed. Dietary supplements such as vitamins and minerals have been proposed to increase the intelligence coefficient in subjects with DS. These approaches are based on the premise that a biochemical imbalance exists in DS. However, recent reviews clearly show no effectiveness of vitamin or mineral supplement in any of the included trials (Salman, 2002; Roizen and Patterson, 2003). Given what is now known regarding the critical periods for synaptic development and the organisation of large-scale neuronal circuits in the developing cerebral cortex, it appears that there may exist a window of opportunity during which specifically targeted, pharmacologic intervention could exert a significantly favourable biologic effect during development. Pharmacologic agents that increase the brain's responsiveness to activity-dependent plasticity may be of particular therapeutic benefit to children with some forms of mental retardation. Currently available medications have targeted cholinergic neurotransmission and to a lesser degree glutamatergic neurotransmission, both of which play important roles in learning, memory, and developmental organisation of the brain.

Enhancement of electrochemical signalling in the brain is based on chemical facilitation of existing synaptic function and is considered to be of short-term benefit. Current pharmacologic strategies, including nootropic drugs such as piracetam, a cyclic derivative of gamma amino butyric acid (GABA), are claimed to improve the efficiency of higher order functions in the brain that are involved in cognitive processes such as learning and memory. In addition, based on studies in animals demonstrating synergistic effects of

combined piracetam/choline treatment, this combination treatment has been recommended for DS. However, the first formal assessment of the efficacy of piracetam in DS has not been positive (Lobaugh et al., 2001). Results from a recently reported double-blind, placebo-controlled, crossover study of the efficacy of piracetam for increasing cognitive functioning in DS have shown not only that piracetam treatment did not enhance cognitive performance but also that it was associated with a number of adverse effects in children with DS. More recently, the efficacy of piracetam treatment has been explored in Ts65Dn mice, and after cognitive evaluation, the data reveal no support for the treatment of individuals with DS (Moran et al., 2002).

The “cholinergic hypothesis” of memory dysfunction has done much to focus research efforts on cholinergic strategies for the enhancement of learning and memory. Medications that affect cholinergic neurotransmission include acetylcholine precursors, acetylcholinesterase inhibitors, and muscarinic agonists. DS is associated with early dementia with similarities in pathology and biochemistry to AD, providing a rationale for the use of cholinesterase inhibitors (see Gustavson and Cummings, 2003). There is a known loss of cholinergic neurons providing input to limbic structures and cortex in both AD and DS. There is accumulation of abnormal beta-amyloid in both disorders, which presumably causes neuronal death and hence a presynaptic deficit. Cholinesterase inhibitors can be predicted to be helpful in this disorder and are beneficial for some of the cognitive and functional deficits associated with AD. However, despite considerable theoretical reasons to suggest patients with DS, especially those with concurrent dementia, could derive benefit from cholinesterase inhibitor therapy, there are currently few studies reported in the literature from which to draw a conclusion. Some authors claim improvement in socialisation subscale and adaptive behaviour composite score (Kishnani et al., 1999) in patients with DS with or without dementia (Lott et al., 2002; Prasher et al., 2002). Others report no clinical benefit and frequent adverse effects (Cipriani et al., 2002; Hemingway-Eltomey and Lerner, 1999). Recently, adults with DS were treated with donepezil as a therapy for language deficits. The results indicate an improvement in expressive language performance in patients with DS (Heller et al., 2003).

Tests of various hormone therapies, including thyroid, steroid and growth hormone have yielded only poor results. However, a recent study carried out in Ts65Dn mice indicates that estrogen treatment can restore cognition and cholinergic phenotype. The authors show that female mice (11–15 months) that received a subcutaneous estrogenic pellet improved learning of a T-maze task and normalized behaviour in reversal learning of the task, a measure of cognitive flexibility (Granholm et al., 2000). Moreover, the total number of cholinergic neurons in the medial septum, identified by alterations in amyloid precursor protein as well as dendritic and cholinergic markers, increased (Granholm et al., 2002, 2003). The authors suggest that estrogenic

treatment might be a viable therapeutic approach for women with DS coupled with dementia.

Drugs targeting the glutamatergic system are among the most novel modalities in treating disorders of memory and learning. These drugs have grown in proportion to advancements in our understanding of the physiologic and pathologic alterations underlying mental retardation.

Animal models of memory formation indicate that synaptic events lead to an intracellular cascade involving calcium fluxes, a variety of protein kinases, and activation of transcription factors and immediate early genes such as c-Fos, c-Jun and Zif-268 (see Rose, 2002 for review). An important step in this sequence involves the cyclic-AMP-responsive-element-binding protein (CREB), which is implicated in memory formation in both *Drosophila* and mice. However, the ability of these interventions to enhance human memory through facilitation on synaptic activity-dependent events remains speculative at present.

Although gene therapy for DS is probably years down the road, it holds great promise for increasing the specificity of treatments while reducing unnecessary or dangerous side effects. In DS, where overexpression of a number of genes exists, gene therapy approaches will have to focus in reducing gene expression. As we begin to understand the function of specific genes and identify the contribution of individual genes to the overall phenotype, partial gene therapy for specific defects could be a good approach. One of the main caveats for gene therapy is that it requires a technology capable of gene transfer in a wide variety of cells, tissues and whole organs. To date, antisense oligonucleotides or ribozymes were the only available tools for reducing gene expression. Several *in vivo* studies have shown that antisense oligonucleotides directly delivered to the brain of animals modify behaviour (Zapata et al., 1997; Persico et al., 1998). This finding strongly supports the proposal that reducing gene expression by gene therapy approaches has the potential to treat disorders associated with gene overexpression in the CNS. Although still not optimum, several delivery vectors are available to introduce genes (Somia and Verma, 2000). Highly efficient systems, such as adenovirus, adeno-associated virus and more recently lentivirus, deliver genes into mature neurons both *in vivo* and *in vitro*, allowing the design of gene therapies for brain diseases (Costantini et al., 2000). A novel, very powerful gene silencing mechanism, RNA interference (RNAi), recently was discovered. Gene therapy approaches that are being developed that are based on this technology hold great promise for targeting candidate overexpressed genes in DS (McManus and Sharp, 2002; Song et al., 2003).

4.2. Non-pharmacological strategies

Early implementation of special education programs leads to improved cognitive abilities in individuals with DS (Connolly et al., 1993; Foreman and Manning, 1986) but the

cognitive improvements achieved are limited, and temporary. The neural correlates of the temporary effects are unknown. Animals reared in enriched environments outperform conspecifics in learning, memory and visual acuity, suggesting that circuits are modified in order to optimise multiple levels of information processing and storage (Fernandez-Teruel et al., 1997; Prusky et al., 2000). Structural differences in the cerebral cortex are thought to underpin these behavioural improvements. Past studies of the intact brain using Golgi impregnated material correlate changes in dendritic spine morphology with development, enriched environment and aging. The rationale for these studies is that alterations in these conditions would exert major changes in brain structure and function (Rosenzweig et al., 1972; Volkmar and Greenough, 1972; Globus et al., 1973). These studies show that experience correlates with an increase in the spine density, in the complexity of dendritic arbourisation and in the length of cortical dendrites.

Recently, the effect of enriched environment applied to pups for 7 weeks after weaning upon behavioural and cognitive performances was assessed in partially trisomic Ts65Dn mice. Exposure to complex environments modulated behaviour and spatial memory in Ts65Dn and euploid mice (Martinez-Cue et al., 2002). Moreover, the effects on behaviour were sex-specific. Environmental enrichment induced a slight but significant improvement of performance in Ts65Dn females but worsened performance in Ts65Dn male mice in the Morris water maze. These results indicate that gender is a factor that impacts this behavioural intervention (Martinez-Cue et al., 2002).

In our experimental design (Dierssen et al., 2003), euploid, non-trisomic mice exposed to an enriched environment showed increases in dendritic complexity and in the number of spines. These effects could account for the better performance on some of the behavioural tasks. However, environmental enrichment did not alter the spine density or the number of spines in Ts65Dn mice. These results suggest that the molecular pathways that mediate neuronal reinforcement in the early stages of pruning might be affected by the partial trisomy of MMU16, resulting in different behavioural and cognitive abilities. Despite the marked differences in the number of spines found on the dendritic arbours of pyramidal cells in the different experimental groups, the distribution of the spines throughout the arbours remains remarkably similar (Elston and DeFelipe, 2002).

Mechanisms that determine spine morphology remain controversial. In cortex, it has been suggested that processes which lead to shrinkage and elongation of dendritic spines are controlled locally. In contrast, processes leading to the formation of novel spines may extend beyond local biochemical events (Smart and Halpain, 2000) or may be engineered centrally, through messages arriving from the soma, where a global increase in dendritic spine density is seen after a nuclear message (phosphorylation of CREB) (see Segal, 2001 for review).

Recently it has been documented that levels of neurotrophic factors such as BDNF increase in the central nervous system in response to enhanced environmental complexity (Falkenberg et al., 1992; Ickes et al., 2000; Pham et al., 1999; Torasdotter et al., 1998). Levels of BDNF are altered in Ts65Dn mice and in children with DS (Calamandrei et al., 2000). This neurotrophic factor impacts the survival of the basal proencephalon cholinergic nucleus (Cooper et al., 2001; Delcroix et al., 2004). Other candidate molecules that guide morphological restructuring, synaptogenesis, and synaptic weighing and that control the plastic changes induced by environmental enrichment in the CNS (Rampon et al., 2000) may also be affected in this DS model. Thus, the behavioural consequences of enrichment observed in the Ts65Dn mice may not be entirely the result of the structural reorganisation of the pyramidal cells of the frontal cortex. Since stable long-term changes in spines are involved in the formation of stable memories, it might be argued that the less-stable behavioural effects of environmental enrichment could be dependent on more transient effects on functional synaptic mechanisms.

5. Conclusions

This paper addresses the mechanisms that cause mental deficiency in Down syndrome and the enduring question of the relationship between structure and function in the cerebral cortex. DS is associated with several brain abnormalities including altered cortical volume, stratification, dendritic atrophy, cellular differentiation and synaptic dysgenesis during the post-natal period. Some of these changes, such as dendritic alterations are also present in other cognition disorders and have been proposed as the most consistent anatomopathological feature of mental retardation. A better understanding of DS neuronal networks is essential to understand the alterations of cognitive processes, and to achieve this goal animal models have enormous potential to elucidate mental retardation mechanisms that may be acting in humans. Animal models can overcome many of the limitations inherent in studies of human patients, such as rarity of the disease, extremely complex genetic background and logistical and ethical constraints in the design and execution of experiments with human subjects. To date, these models have helped in the clarification of the pathophysiology/pathogenetic mechanism of disease and they will serve the exploration of therapeutic approaches in the near future. Studies with the various animal models of DS at different developmental stages have recreated certain conditions that result in abnormal learning capabilities in DS, and previous work has found abnormalities of cortical volume, lamination, proliferation and connectivity. We propose that some genes are major candidates to explain the dendritic spine functional and structural alteration. These genes will most probably be those who have been proven to produce a dosage-dependent

phenotype. Changes in levels of expression of these genes may lead to changes in timing and synaptic interaction between neurons during development, which can lead to less than optimal functioning of neural circuitry and signalling at that time and in later life.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants of Jerôme Lejeune Foundation, European Union (QLG1-CT-2002-00816), CICYT (SAF2001-1231), and DGCYT, Australian National Health and Medical Research Council (GNE), Comunidad Autónoma de Madrid (RB-P, 01/0782/2000), Fundación CIEN.

References

- 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. *Cytogenet. Cell. Genet.* 93, 270–276.
- Anneren, G., Puschel, S.M., 1996. Preventive medical care. In: Stratford, B., Gunn, P. (Eds.), *New Approaches to Down Syndrome*, Casell, London.
- Asada, H., Uyemura, K., Shirao, T., 1994. Actin-binding protein, drebrin, accumulates in submembranous regions in parallel with neuronal differentiation. *J. Neurosci. Res.* 38, 149–159.
- Bacon, J.P., Murphey, R.K., 1984. Receptive fields of cricket giant interneurons are related to their dendritic structure. *J. Physiol.* 352, 601–623.
- Bambrick, L.L., Krueger, B.K., 1999. Neuronal apoptosis in mouse trisomy 16: mediation by caspases. *J. Neurochem.* 72, 1769–1772.
- Bartlett, W.P., Banker, G.A., 1984. An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. Cells which develop without intercellular contacts. *J. Neurosci.* 4, 1944–1953.
- Baxter, L.L., Moran, T.H., Richtsmeier, J.T., Troncoso, J., Reeves, R., 2000. Discovery and genetic localization of Down syndrome cerebellar phenotypes using the Ts65Dn mouse. *Hum. Mol. Genet.* 9, 195–202.
- Benavides-Piccione, R., Dierssen, M., Ballesteros-Yáñez, I., Martínez de Lagrán, M., Arbonés, M.L., Fotaki, V., DeFelipe, J., Elston, G.N., 2004. Brain size and circuit complexity: a study of the cerebral cortex in *Dyrk1A* +/- mouse. *Neurobiology Disease* (submitted).
- Benavides-Piccione, R., Dierssen, M., Ballesteros-Yáñez, I., Martínez de Lagrán, M., Arbonés, M., Fotaki, V., Estivill, X., DeFelipe, J., Elston, G.N., submitted. A study of the pyramidal cell phenotype in the *Dyrk1A* +/- mouse model implicates *DYRK1A* as a candidate gene for mental retardation in microcephaly cerebral cortex. *Neurobiol. Dis.*
- Becker, L.E., Armstrong, D.L., Chan, F., 1986. Dendritic atrophy in children with Down's syndrome. *Ann. Neurol.* 20, 520–526.
- Becker, L., Mito, T., Takashima, S., Onodera, K., 1991. Growth and development of the brain in Down syndrome. *Prog. Clin. Biol. Res.* 373, 133–152.
- Bimonte-Nelson, H.A., Hunter, C.L., Nelson, M.E., Granholm, A.C., 2003. Frontal cortex BDNF levels correlate with working memory in an animal model of Down syndrome. *Behav. Brain Res.* 139, 47–57.
- Buchs, P.-A., Muller, D., 1996. Induction of long-term potentiation is associated with major ultrastructural changes of activated synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 8040–8045.
- Cairns, N.J., 2001. Molecular neuropathology of transgenic mouse models of Down syndrome. *J. Neural Transm. Suppl.* 61, 289–301.
- Calamandrei, G., Alleva, E., Cirulli, F., Queyras, A., Volterra, V., Capirci, O., Vicari, S., Giannotti, A., Turrini, P., Aloe, L., 2000. Serum NGF levels in children and adolescents with either Williams syndrome or Down syndrome. *Dev. Med. Child Neurol.* 42, 746–750.
- 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. *J. Biol. Chem.* 277, 17597–17604.
- Cipriani, G., Bianchetti, A., Trrabucchi, M., 2002. Donepezil use in the treatment of dementia associated with Down syndrome. *Arch. Neurol.* 60, 292.
- Costantini, L.C., Bakowska, J.C., Breakefield, X.O., Isacson, O., 2000. Gene therapy in the CNS. *Gene Ther.* 7, 93–109.
- Cooper, J.D., Salehi, A., Delcroix, J.D., Howe, C.L., Belichenko, P.V., Chua-Couzens, J., Kilbridge, J.F., Carlson, E.J., Epstein, C.J., Mobley, W.C., 2001. Failed retrograde transport of NGF in a mouse model of Down's syndrome: reversal of cholinergic neurodegenerative phenotypes following NGF infusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10439–10444.
- Comery, T.A., Stamoudis, C.X., Irwin, S.A., Greenough, W.T., 1996. Increased density of multiple-head dendritic spines on medium-sized spiny neurons of the striatum in rats reared in a complex environment. *Neurobiol. Learn. Mem.* 66, 93–96.
- Connolly, B.H., Morgan, S.B., Russell, F.F., Fulliton, W.L., 1993. A longitudinal study of children with Down syndrome who experienced early intervention programming. *Phys. Ther.* 73, 170–179.
- Coussons-Read, M.E., Crnic, L.S., 1996. Behavioral assessment of the Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome: altered behavior in the elevated plus maze and open field. *Behav. Genet.* 26, 7–13.
- Crawley, J., Paylor, R., 1997. A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Horm. Behav.* 31, 197–211.
- Crick, F., 1982. Do dendritic spines twitch? *Trends Neurosci.* 5, 44–46.
- Davisson, M.T., Schmidt, C., Akeson, E.C., 1990. Behavioral trisomy for murine chromosome 16: a new system for studying Down syndrome. In: Patterson, D., Epstein, C.J. (Eds.), *Molecular Genetics of Chromosome 21 and Down syndrome*. Wiley-Liss, New York, pp. 263–280.
- DeFelipe, J., Fariñas, I., 1992. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog. Neurobiol.* 39, 563–607.
- 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.
- Delcroix, J.D., Valletta, J., Wu, C., Howe, C.L., Lai, C.F., Cooper, J.D., Belichenko, P.V., Salehi, A., Mobley, W.C., 2004. Trafficking the NGF signal: implications for normal and degenerating neurons. *Prog. Brain Res.* 146, 3–23.
- Dickson, D.W., 1997. The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 321–339.
- Dierssen, M., Vallina, I.F., Baamonde, C., García-Calatayud, S., Lumbreras, M.A., Flórez, J., 1997. Alterations of central noradrenergic transmission in Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Brain Res.* 749, 238–243.
- Dierssen, M., Vallina, I.F., Baamonde, C., Lumbreras, M.A., Martínez-Cué, C., Calatayud, S.G., Flórez, J., 1996. Impaired cyclic AMP production in the hippocampus of a Down syndrome murine model. *Dev. Brain Res.* 95, 122–124.
- Dierssen, M., Pritchard, M., Fillat, C., Arbonés, M., Aran, J.M., Flórez, J., Estivill, X., 1999. Modelling Down syndrome in mice. In: Gerlai, R., Crusio, W. (Eds.), *Molecular-Genetic Techniques for Brain and Behavior Research*, Elsevier.
- Dierssen, M., Fillat, C., Crnic, L., Arbones, M., Florez, J., Estivill, X., 2001. Murine models for Down syndrome. *Physiol. Behav.* 73, 859–871.
- Dierssen, M., Benavides-Piccione, R., Martínez-Cué, C., Estivill, X., Flórez, 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. *Cereb. Cortex* 13, 758–764.
- Dorsey, S.G., Bambrick, L.L., Balice-Gordon, R.J., Krueger, B.K., 2002. Failure of brain-derived neurotrophic factor-dependent neuron survival in mouse trisomy 16. *J. Neurosci.* 22, 2571–2578.
- Elston, G.N., 2003a. Cortex, cognition and the cell: new insights into the pyramidal neuron and prefrontal function. *Cereb. Cortex* 13, 1124–1138.
- Elston, G.N., 2003b. The pyramidal neuron in occipital, temporal and prefrontal cortex of the owl monkey (*Aotus trivirgatus*): regional specialization in cell structure. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1313–1318.
- Elston, G.N., Benavides-Piccione, R., DeFelipe, J., 2001. The pyramidal cell in cognition: a comparative study in human and monkey. *J. Neurosci.* 21, RC163.
- Elston, G.N., DeFelipe, J., 2002. Spine distribution in cortical pyramidal cells: a common organizational principle across species. *Prog. Brain Res.* 136, 109–133.
- Engert, F., Bonhoeffer, T., 1999. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66–70.
- Escorihuela, R.M., Fernández-Teruel, A., Vallina, I.F., Baamonde, C., Lumberas, M.A., Dierssen, M., Tobeña, A., Flórez, J., 1995. Behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative DS model. *Neurosci. Lett.* 199, 143–146.
- Escorihuela, R.M., Vallina, I.F., Martínez-Cués, C., Baamonde, C., Dierssen, M., Tobeña, A., Flórez, J., Fernández-Teruel, A., 1998. Impaired short- and long-term memory in Ts65Dn mice, a model for DS. *Neurosci. Lett.* 247, 171–174.
- Falkenberg, T., Mohammed, A.K., Henriksson, B., Persson, H., Winblad, B., Lindfors, N., 1992. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci. Lett.* 138, 153–156.
- Fernandez-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Castellano, B., Gonzalez, B., Tobeña, A., 1997. Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behav. Genet.* 27, 513–526.
- Ferrer, I., Guillotta, F., 1990. Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 79, 680–685.
- Flórez, J., 1992. Neurologic abnormalities. In: Pueschel, S.M., Pueschel, J.K., Paul, H. (Eds.), *Biomedical Concerns in Persons with Down Syndrome*. Brookes Pub. Co, Baltimore, pp. 159–173.
- Foreman, P.J., Manning, E., 1986. Paediatric management practices in Down syndrome: a follow-up survey. *J. Paediatr. Child Health* 29, 27–31.
- Fotaki, V., Dierssen, M., Alcántara, S., Martínez, S., Martí, E., Casas, C., Visa, J., Soriano, E., Estivill, X., Arbonés, M.L., 2002. Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Mol. Cell Biol.* 22, 6636–6647.
- Friedlander, M.J., Stanford, L.R., Sherman, S.M., 1982. Effects of monocular deprivation on the structure–function relationship of individual neurons in the cat's lateral geniculate nucleus. *J. Neurosci.* 2, 321–330.
- Galdzicki, Z., Siarey, R.J., 2003. Understanding mental retardation in Down's syndrome using trisomy 16 mouse models. *Genes Brain Behav.* 2, 167–178.
- Gardiner, K., Fortna, A., Bechtel, L., Davisson, M.T., 2003. Mouse models of Down syndrome: how useful can they be? Comparison of the gene content of human chromosome 21 with orthologous mouse genomic regions. *Gene* 318, 137–147.
- Gearhart, J.D., Davisson, M.T., Oster-Granite, M.L., 1986. Autosomal aneuploidy in mice: generation and developmental consequences. *Brain Res. Bull.* 16, 789–801.
- Geinisman, Y., de Toledo-Morrell, F., Persina, I.S., Rossi, M., 1992. Age-related loss of axospinous synapses formed by two afferent systems in the rat dentate gyrus as revealed by the unbiased stereological disector technique. *Hippocampus* 2, 437–444.
- Gerlai, R., 1996. Gene targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background phenotype? *Trends Neurosci.* 19, 177–181.
- Gitton, Y., Dahmane, N., Baik, S., Ruiz i Altaba, A., Neidhardt, L., Scholze, M., Herrmann, B.G., Kahlem, P., Benkhalha, A., Schrunner, S., Yildirimman, R., Herwig, R., Lehrach, H., Yaspo, M.L., 2002. HSA21 expression map initiative. A gene expression map of human chromosome 21 orthologues in the mouse. *Nature* 420, 586–590.
- Globus, A., Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L., Diamond, M.C., 1973. Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 82, 175–181.
- 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.
- Granhölm, A.-C., Sanders, E., Crnic, L.A., 2000. Loss of cholinergic phenotype in basal forebrain coincides with cognitive decline in a mouse model of Down's syndrome. *Exp. Neurol.* 161, 647–663.
- Granhölm, A.E., Ford, K.A., Hyde, L.A., Bimonte, H.A., Hunter, A.L., Nelson, M., Albeck, D., Sanders, L.A., Mufson, E.J., Crnic, L.S., 2002. Estrogen restores cognition and cholinergic phenotype in an animal model of Down syndrome. *Physiol. Behav.* 77, 371–385.
- Granhölm, A.C., Sanders, L., Seo, H., Lin, L., Ford, K., Isacson, O., 2003. Estrogen alters amyloid precursor protein as well as dendritic and cholinergic markers in a mouse model of Down syndrome. *Hippocampus* 13, 905–914.
- Grausz, H., Richtsmeier, J.T., Oster-Granite, M.L., 1991. Morphogenesis of the brain and craniofacial complex in trisomy 16 mice. In: Epstein, C.J. (Ed.), *The Morphogenesis of Down Syndrome*. Wiley-Liss, New York, pp. 169–188.
- Gustavson, A.R., Cummings, J.L., 2003. Cholinesterase inhibitors in non-Alzheimer dementias. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* 4 (6 Suppl.), 165–169.
- Hammerle, B., Vera-Samper, E., Speicher, S., Arencibia, R., Martínez, 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.
- Hammerle, B., Carnicero, A., Elizalde, C., Ceron, J., Martínez, 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.
- Harris, K.M., 1999. Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 343–348.
- Hassold, T., Jacobs, P., 1984. Trisomy in man. *Ann. Rev. Genet.* 18, 69–97.
- Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T.D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H.S., Toyoda, A., Ishii, K., Totoki, Y., Choi, D.K., 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., 2000a. The DNA sequence of human chromosome 21. The chromosome 21 mapping and sequencing consortium. *Nature* 405, 311–319.
- 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., 2000b. Chromosome 21 mapping and sequencing consortium. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 405, 311–319.
- Hayashi, K., Shirao, T., 1999. Change in the shape of dendritic spines caused by overexpression of drebrin in cultured cortical neurons. *J. Neurosci.* 19, 3918–3925.

- Hayashi, K., Ishikawa, R., Ye, L.H., He, X.L., Takata, K., Kohama, K., Shirao, T., 1996. Modulatory role of drebrin on the cytoskeleton within dendritic spines in the rat cerebral cortex. *J. Neurosci.* 16, 7161–7170.
- 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. *J. Neurosci.* 16, 6175–6182.
- Haydar, T.F., Nowakowsky, R.S., Yarowsky, P.J., Krueger, B.K., 2000. Role of founder cell deficit and delayed neuronogenesis in microcephaly of the trisomy 16 mouse. *J. Neurosci.* 20, 4156–4164.
- Heller, J.H., Spiridigliozzi, G.A., Sullivan, J.A., Doraiswamy, P.M., Krishnan, R.R., Kishnani, P.S., 2003. Donepezil for the treatment of language deficits in adults with down syndrome: a preliminary 24-week open trial. *Am. J. Med. Genet.* 116B, 111–116.
- Hemingway-Eltomey, J.M., Lerner, A.J., 1999. Adverse effects of donepezil in treating Alzheimer's disease associated with Down's syndrome. *Am. J. Psychiatry* 156, 1470.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13333–13338.
- Horner, C.H., 1993. Plasticity of the dendritic spine. *Prog. Neurobiol.* 41, 281–321.
- Hunter, C.L., Bimonte, H.A., Granholm, A.C., 2003. Behavioral comparison of 4 and 6 month-old Ts65Dn mice: age-related impairments in working and reference memory. *Behav. Brain Res.* 138, 121–131.
- Huttenlocher, P.R., 1990. Morphometric study of human cerebral cortex development. *Neuropsychologia* 28, 517–527.
- Hyde, L.A., Frisone, D.F., Crnic, L.S., 2001. Ts65Dn mice, a model for Down syndrome, have deficits in context discrimination learning suggesting impaired hippocampal function. *Behav. Brain Res.* 118, 53–60.
- Hyde, L.A., Crnic, L.S., 2002. Reactivity to object and spatial novelty is normal in older Ts65Dn mice that model Down syndrome and Alzheimer's disease. *Brain Res.* 945, 26–30.
- Ickes, B.R., Pham, T.M., Sanders, L.A., Albeck, D.S., Mohammed, A.H., Granholm, A.C., 2000. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp. Neurol.* 164, 45–52.
- Insausti, A.M., Megías, M., Crespo, D., Cruz-Orive, L.M., Dierssen, M., Vallina, I.F., Insausti, R., Flórez, J., 1998. Hippocampal volume and neuronal number in Ts65Dn mice: a murine model of Down syndrome. *Neurosci. Lett.* 253, 1–4.
- Jacobs, B., Scheibel, A.B., 2002. Regional dendritic variation in primate cortical pyramidal cells. In: Schüz, A., Miller, R. (Eds.), *Cortical Areas: Unity And Diversity*. Taylor and Francis, London, pp. 111–131.
- Jones, T.A., Klintsova, A.Y., Kilman, V.L., Sirevaag, A.M., Greenough, W.T., 1997. Induction of multiple synapses by experience in the visual cortex of adult rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 68, 13–20.
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., Nakahara, H., 2003. Trends Neurosci. Structure-stability-function relationships of dendritic spines 26, 360–368.
- Kaufmann, W.E., Worley, P.F., Taylor, C.V., Bremer, M., Isakson, P.C., 1997. Cyclooxygenase 2 expression during rat neocortical development and in Rett syndrome. *Brain Dev.* 19, 25–34.
- Kaufmann, W.E., 1999. Cytoskeletal determinants of dendritic development and function: implications for mental retardation. *Devl. Neuropsychol.* 16, 341–346.
- Kaufmann, W., Moser, H.W., 2000. Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb. Cortex* 10, 981–991.
- Kemper, T.L., 1988. Neuropathology of Down syndrome. In: Nadel, L. (Ed.), *The psychobiology of Down syndrome*. MIT Press, Cambridge, MA, pp. 269–289.
- Kim, C.B.Y., Pier, L.P., Spear, P.D., 1997. Effects of ageing on numbers and sizes of neurons in histochemically defined subregions of monkey striate cortex. *Anat. Rec.* 247, 119–128.
- Kishnani, P.S., Sullivan, J.A., Walker, B.K., Spiridigliozzi, G.A., Doraiswamy, P.M., Krishnan, R.R., 1999. Cholinergic therapy for Down's syndrome. *Lancet* 353, 1064–1065.
- Kossel, A., Lowel, S., Bolz, J., 1995. Relationships between dendritic fields and functional architecture in striate cortex of normal and visually deprived cats. *J. Neurosci.* 15, 3913–3926.
- 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 Res.* 858, 191–197.
- Lange, A.W., Molkentin, J.D., Yutzey, K.E., 2004. DSCR1 gene expression is dependent on NFATc1 during cardiac valve formation and colocalizes with anomalous organ development in trisomy 16 mice. *Dev. Biol.* 266, 346–360.
- Lendvai, B., Stern, E.A., Chen, B., Svoboda, K., 2000. Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature* 404, 876–881.
- Lobaugh, N.J., Karaskov, V., Rombough, V., 2001. Piracetam therapy does not enhance cognitive functioning in children with Down syndrome. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 155, 442–448.
- Lott, I.T., Osann, K., Doran, E., Nelson, L., 2002. Down syndrome and Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 59, 1133–1136.
- Maletic-Savatic, M., Malinow, R., Svoboda, K., 1999. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283, 1923–1927.
- Marin-Padilla, M., 1972. Structural abnormalities of the cerebral cortex in human chromosomal aberrations. A Golgi study. *Brain Res.* 44, 625–629.
- Marin-Padilla, M., 1976. Pyramidal cell abnormalities in the motor cortex of a child with Down's syndrome: a Golgi study. *J. Comp. Neurol.* 16, 63–81.
- Martínez-Cué, C., Baamonde, C., Vallina, I.F., Lumberras, M.A., Dierssen, M., Flórez, J., 1999. Reduced responsiveness of Ts65Dn mice to pain. *Neuroreport* 10, 1119–1122.
- Martínez-Cue, C., Baamonde, C., Lumberras, M., Paz, J., Davisson, M.T., Schmidt, C., Dierssen, M., Florez, J., 2002. Differential effects of environmental enrichment on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behav. Brain Res.* 134, 185–200.
- Mastroiacovo, P., 2002. Epidemiology of Down syndrome in the third millennium. 2nd International conference EDSA 'The Adult with Down Syndrome. A new Challenge for Society', San Marino.
- McManus, M.T., Sharp, P.A., 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* 3, 373–3746.
- Miyabara, S., Sugihara, H., Yonemitsu, N., Yun, K., 1984. Comparative study of phenotypic expression of mice trisomy 16 by different female strains: attempt at an animal model for human trisomy 21. *Cogn. Anomal.* 24, 283–292.
- Montero, J.J., Flórez, J., Baamonde, C., Vallina, I.F., García-Calatayud, S., Dierssen, M., 1996. Valoración ecográfica mediante doppler pulsado de la función cardíaca en el ratón Ts65Dn, un modelo murino de síndrome de Down. *Rev. Síndrome Down* 13, 31–32.
- Moran, T.H., Capone, G.T., Knipp, S., Davisson, M.T., Reeves, R., Gearhart, J.D., 2002. The effects of piracetam on cognitive performance in a mouse model of Down's syndrome. *Physiol. Behav.* 77, 403–409.
- Olson, L.E., Roper, R.J., Baxter, L.L., Carlson, E.J., Epstein, C.J., Reeves, R.H., 2004. Down syndrome mouse models Ts65Dn, Ts1Cje, and Ms1Cje/Ts65Dn exhibit variable severity of cerebellar phenotypes. *Dev. Dyn.* 230, 581–589.
- Oster-Gرانite, M.L., 1986. The neurobiological consequences of autosomal aneuploidy in mice and men. *Brain Res. Bull.* 16, 767–771.
- Parnavelas, J.G., Lynch, G., Brecha, N., Cotman, C.W., Globus, A., 1974. Spine loss and regrowth in hippocampus following deafferentation. *Nature* 248, 71–73.
- Penzes, P., Beeser, A., Chernoff, J., Schiller, M., Eipper, B.A., Mains, R.E., Huganir, R.L., 2003. Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron* 37, 263–274.

- Persico, A.M., Schindler, C.W., Davis, S., Ambrosio, E., Uhl, G., 1998. Medial prefrontal cortical injections of c-fos antisense oligonucleotides transiently lower c-Fos protein and mimic amphetamine withdrawal behaviours. *Neuroscience* 82, 1115–1129.
- Petit, T.L., LeBoutillier, J.C., Gregorio, A., Libstug, H., 1988. The pattern of dendritic development in the cerebral cortex of the rat. *Dev. Brain Res.* 41, 209–219.
- Pham, T.M., Ickes, B., Albeck, D., Soderstrom, S., Granholm, A.C., Mohammed, A.H., 1999. Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. *Neuroscience* 94, 279–286.
- Pinter, J.D., Eliez, S., Schmitt, J.E., Capone, G.T., Reiss, A.L., 2001. Neuroanatomy of Down's syndrome: a high-resolution study. *Am. J. Psychiatry* 58, 1659–1665.
- Purpura, D.P., 1974. Dendritic spine dysgenesis and mental retardation. *Science* 186, 1126–1128.
- Prasher, V.P., Huxley, A., Haque, M.S., Down syndrome Ageing Study Group, 2002. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 17, 270–278.
- Prinz, M., Prinz, B., Schulz, E., 1997. The growth of non-pyramidal neurons in the primary motor cortex of man: a Golgi study. *Histol. Histopathol.* 12, 895–900.
- Pritchard, M.A., Kola, I., 1999. The gene dosage effect hypothesis versus the amplified developmental instability hypothesis in Down syndrome. *J. Neural. Transm. Suppl.* 57, 293–303.
- Prusky, G.T., Reidel, C., Douglas, R.M., 2000. Environmental enrichment from birth enhances visual acuity but not place learning in mice. *Behav. Brain Res.* 114, 11–15.
- Rampon, C., Jiang, C.H., Dong, H., Tang, Y.P., Lockhart, D.J., Schultz, P.G., Tsien, J.Z., Hu, Y., 2000. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 12880–12884.
- Raz, N., Torres, L.J., Briggs, S.D., Spencer, W.D., Thornton, A.E., Loken, W.J., Gunning, F.M., McQuain, J.D., Driesen, N.R., Acker, J.D., 1995. Selective neuroanatomic abnormalities in Down's syndrome and their cognitive correlates: evidence from MRI morphometry. *Neurology* 45, 356–366.
- 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 (2), 177–184.
- Reymond, A., Marigo, V., Yaylaoglu, M.B., Leoni, A., Ucla, C., Scamuffa, N., Caccioppoli, C., Dermitzakis, E.T., Lyle, R., Banfi, S., Eichele, G., Antonarakis, S.E., Ballabio, A., 2002. Human chromosome 21 gene expression atlas in the mouse. *Nature* 420, 582–586.
- Richtsmeier, J.T., Baxter, L., Reeves, R., 2000. Parallels of craniofacial development in Down syndrome and Ts65Dn mice. *Develop. Dynam.* 217, 137–145.
- Rogers, D.C., Fisher, E.M., Brown, S.D., Peters, J., Hunter, A.J., Martin, J.E., 1997. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm. Genome* 8, 711–713.
- Roizen, N.J., Patterson, D., 2003. Down's syndrome. *Lancet* 361, 1281–1289.
- Rose, S.P., 2002. Smart drugs: do they work? Are they ethical? Will they be legal?. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 975–979.
- Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L., Diamond, M.C., 1972. Brain changes in relation to experience. *Sci. Am.* 226, 22–29.
- Ruiz de Azua, I., Lumbereras, M.A., Zalduegui, A., Baamonde, C., Dierssen, M., Florez, J., Salles, J., 2001. Reduced phospholipase C-beta activity and isoform expression in the cerebellum of TS65Dn mouse: a model of Down syndrome. *J. Neurosci. Res.* 66, 540–545.
- Sago, H., Carlson, E.J., Smith, D., Kilbridge, J., Rubin, E.M., Mobley, W., Epstein, C.J., Huang, T., 1998. Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 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.
- Salman, M.S., 2002. Systematic review of the effect of therapeutic dietary supplements and drugs on cognitive function in subjects with Down syndrome. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 6, 213–219.
- Saran, N.G., Pletcher, M.T., Natale, J.E., Cheng, Y., Reeves, R.H., 2003. Global disruption of the cerebellar transcriptome in a Down syndrome mouse model. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2013–2019.
- Schulz, E., Scholz, B., 1992. Neurohistological findings in the parietal cortex of children with chromosome aberrations. *J. Hirnforsch* 33, 37–62.
- Segal, M., 1995. Morphological alterations in dendritic spines of rat hippocampal neurons exposed to *N*-methyl-D-aspartate. *Neurosci. Lett.* 193, 73–76.
- Shapiro, B.L., 1999. The Down syndrome critical region. *J. Neural. Transm. Suppl.* 57, 41–60.
- Shapiro, M.B., Haxby, J.V., Grady, C.L., 1992. Nature of mental retardation and dementia in Down syndrome: study with PET, CT, and neuropsychology. *Neurobiol. Aging* 13 (6), 723–734.
- Shepherd, G.M., 1996. The dendritic spine: a multifunctional integrative unit. *J. Neurophysiol.* 75, 2197–2210.
- Shim, K.S., Lubec, G., 2002. Drebrin, a dendritic spine protein, is manifold decreased in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neurosci. Lett.* 324, 209–212.
- Siarey, R.J., Stoll, J., Rapoport, S.I., Galdzicki, Z., 1997. Altered long-term potentiation in the young and old Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Neuropharmacology* 36, 1549–1554.
- 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.
- Smart, F.M., Halpain, S., 2000. Regulation of dendritic spine stability. *Hippocampus* 10, 542–554.
- Smith, D.J., Zhu, Y., Zhang, J., Cheng, J.F., Rubin, E.M., 1995. Construction of a panel of transgenic mice containing a contiguous 2-Mb set of YAC/P1 clones from HSA21q22.2. *Genomics* 27, 425–434.
- 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 HSA21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. *Nat. Genet.* 16, 28–36.
- Somia, N., Verma, I.M., 2000. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.* 1, 91–98.
- Song, E., Lee, S.K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., Chen, J., Shankar, P., Lieberman, J., 2003. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat. Med.* 9, 347–351.
- Sorra, K.E., Harris, K.M., 1998. Stability in synapse number and size at 2 h after long-term potentiation in hippocampal area CA1. *J. Neurosci.* 18, 658–671.
- Sorra, K.E., Harris, K.M., 2000. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus* 10, 501–511.
- Stepanyants, A., Hof, P.R., Chklovskii, D.B., 2002. Geometry and structural plasticity of synaptic connectivity. *Neuron* 34, 275–288.
- Suetsugu, M., Mehraein, P., 1980. Spine distribution along the apical dendrites of the pyramidal neurons in Down's syndrome. A quantitative Golgi study. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 50, 207–210.
- 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 Res.* 225, 1–21.
- Takashima, S., Ieshima, A., Nakamura, H., Becker, L.E., 1989. Dendrites, dementia and the Down syndrome. *Brain Dev.* 11, 131–133.
- Teller, J.K., Russo, C., DeBusk, L.M., Angelini, G., Zaccaro, D., Dagna-Bricarelli, F., Scartezini, P., Bertolini, S., Mann, D.M., Tabaton, M., Gambetti, P., 1996. Presence of soluble amyloid beta-peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome. *Nat. Med.* 2, 93–95.

- Tomizuca, K., Yoshida, H., Uejima, H., Kugoh, H., Sato, K., Ohguma, A., Hayasaka, M., Hanaoka, K., Oshimura, M., Ishida, I., 1997. Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice. *Nat. Genet.* 16, 133–143.
- Toni, N., Buchs, P.A., Nikonenko, I., Bron, C.R., Muller, D., 1999. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402, 421–425.
- Torasdotter, M., Metsis, M., Henriksson, B.G., Winblad, B., Mohammed, A.H., 1998. Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus. *Behav. Brain Res.* 93, 83–90.
- Torre, E., McNiven, M.A., Urrutia, R., 1994. Dynamin 1 antisense oligonucleotide treatment prevents neurite formation in cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 269, 32411–32417.
- Volkmar, F.R., Greenough, W.T., 1972. Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat. *Science* 176, 1145–1147.
- Vuksic, M., Petanjek, Z., Rasin, M., Kostovic, I., 2002. Perinatal growth of prefrontal layer III pyramids in Down syndrome. *Pediatr. Neurol.* 27, 36–38.
- Wang, J., Zugates, C.T., Liang, I.H., Lee, C.H., Lee, T., 2002. *Drosophila* Dscam is required for divergent segregation of sister branches and suppresses ectopic bifurcation of axons. *Neuron* 33, 557–559.
- Wenger, G.R., Schmidt, C., Davisson, M.T., 2004. Operant conditioning in the Ts65Dn mouse: learning. *Behav. Genet.* 34, 105–119.
- Weitzdoerfer, R., Dierssen, M., Fountoulakis, M., Lubec, G., 2001. Fetal life in Down syndrome starts with normal neuronal density but impaired dendritic spines and synaptosomal structure. *J. Neural. Transm.* 61, 59–70.
- Wisniewski, K.E., Kida, E., 1994. Abnormal neurogenesis and synaptogenesis in Down syndrome brain. *Dev. Brain Dysfunct.* 7, 289–301.
- Yang, E.J., Ahn, Y.S., Chung, K.C., 2001. Protein kinase Dyrk1 activates cAMP response element-binding protein during neuronal differentiation in hippocampal progenitor cells. *J. Biol. Chem.* 276, 39819–39824.
- Yuste, R., Bonhoeffer, T., 2001. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1071–1089.
- Zapata, A., Capdevila, J.L., Tarrason, G., Adan, J., Martínez, J.M., Piulat, J., Trullás, R., 1997. Effects of NMDA-R1 antisense oligodeoxynucleotide administration: behavioral and radioligand binding studies. *Brain Res.* 745, 114–120.
- Ziv, N.E., Smith, S.J., 1996. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17, 91–102.

Pitfalls And Hopes in Down Syndrome Therapeutic Approaches: In the Search for Evidence-Based Treatments

Mara Dierssen,^{1,2} Jon Ortiz-Abalia,¹ Glòria Arqué,¹ María Martínez de Lagrán,¹ and Cristina Fillat¹

Received 6 Apr. 2005—Final 17 July 2005

Trisomy 21 or Down syndrome (DS) is a complex syndrome, of genetic origin with multiple and variable neurobiological and neuropsychological manifestations. DS patients have consistent signs of brain damage along their lives, but understanding the biology of DS is complicated due to the extraordinary heterogeneity of the phenotypic signs. Thus, treatment of DS mental retardation poses significant challenges for clinicians and scientists. The review addresses the classical pharmacological and environmental treatments and also critically reviews the new possibilities that are emerging from the exciting advances in gene or cell therapy. We describe some of the most recent developments in the field and give a sense of the prospects for future prevention and therapy.

KEY WORDS: Cholinergic; cognitive therapy; down syndrome; environmental treatment; evidence-based treatment; gene therapy; nootropic agents; trisomy 21.

INTRODUCTION

Down syndrome (DS) or trisomy 21 is the most frequent genetic cause of mental retardation with a prevalence of 1:800–1000 live births. Abnormal central nervous system (CNS) function is universal in individuals with DS and is noted during development and adult life (Reviewed in Benavides-Piccione *et al.*, 2004). Hypotonia in the newborn period is followed by developmental delay and mental retardation. In addition, all individuals with DS demonstrate the neuropathology of Alzheimer disease (AD) by age 30–40 years (Wisniweski *et al.*, 1985). The most burdening feature in people with DS is a spectrum of cognitive disabilities that impedes these individuals and their families to have a normally integrated and

independent life. The IQ in DS patients ranges between 20 and 80 and mental retardation is assumed to be the consequence of the abnormal development and function of the CNS. Learning can be complicated by a counterproductive style that includes avoidance strategies when faced with cognitive challenges and deficiency in language production that often causes substantial impairment.

Individuals with DS have other behavioral and psychiatric problems, most frequently a disruptive behavior disorder such as attention deficit, hyperactivity disorder (6.1%), conduct/oppositional disorder (5.4%), or aggressive behavior (6.5%). 25.6% of adults with DS have a psychiatric disorder, most frequently a major depressive disorder or aggressive behavior. The American Academy of Pediatrics and the Down's Syndrome Medical Interest Group have developed guidelines for the medical management of individuals with DS that focus on the medical problems of adolescents and adults (see Roizen and Patterson, 2003, for review).

Here we focus on the therapeutic attempts that have been made on restoring cognition in DS.

¹ Genes and Disease Program, (CRG-UPF), Genomic Regulation Center, Barcelona Biomedical Research Park, 08003, Barcelona, Spain.

² To whom correspondence should be addressed at Genes and Disease Program, (CRG-UPF), Genomic Regulation Center, Barcelona Biomedical Research Park, Passeig Marítim 37–49, 08003, Barcelona, Spain. Tel.: +34-932240940; Fax: +34-932240899; e-mail: mara.dierssen@crg.es

However, in facing this question, it should be borne in mind that DS has been considered a hopeless disease from the therapeutic point of view, as have been other developmental disorders. This lack of confidence in the therapeutic possibilities in DS, along with the erroneous concept that DS frequency will be reduced with the increasing use of the prenatal diagnoses and of therapeutic abortion, has determined the extremely reduced financial investment of public funding agencies for research in this area. However, there is increasing scientific evidence that raises the concept that DS brain holds potential for intervention, but we need to profoundly understand the pathogenesis and precisely determine the best therapeutic targets to be able to develop evidence-based therapies.

One of the most interesting ideas that has emerged from recent research it has been that a progressive neurodegenerative process is burdening DS brains (see Benavides-Piccione *et al.*, 2004 for review). The findings supporting this assumption could explain that the rate of cognitive development tends to slow down as DS children get older (Nadel, 2003). Although in early infancy they function in the low range of typical development, the intelligence quotient decreases in the first decade of life; in the adolescent years cognitive function reaches a plateau that continues into adulthood. In fact, postmortem studies show that DS persons start their lives with an apparently normal neuronal architecture that progressively degenerates. Becker *et al.* (1986) showed that in infants with DS younger than 6 months, dendritic branching and length in both apical and basilar dendrites were greater than in normal infants. During the peak period of dendritic growth and differentiation, quantitative analysis of dendrites in layer IIIc pyramidal neurons of prefrontal cortex (prospective area 9) of the brains of 2.5-month-old infants revealed no significant differences in dendritic differentiation between euploid and DS cases (Vuksic *et al.*, 2002). In contrast, basilar dendrites of cortical pyramidal neurons are shorter than normal in DS subjects older than 4 months (Takashima *et al.*, 1981). Thus, normal or even increased dendritic branching in the DS fetus and newborn contrasts with reduced dendrites and degenerative changes in older children with DS. These findings suggest that children with DS begin their lives with morphologically normal neurons and pathological changes in key prefrontal input-output neuronal elements occur after 2.5 months of postnatal age. Subsequent to this age, there is a steady decrease so that in subjects with

DS older than 2 years, these parameters are reduced relative to controls especially in apical dendrites (Becker *et al.*, 1986). Adult brains of patients with DS present specific features: reduction in brain size, mainly affecting specific brain areas such as the cerebellum and the hippocampus with functional consequences (Pennington *et al.*, 2003), decreased number and depth of sulci in the cerebral cortex, neuronal heterotopias, abnormal neuronal migration/differentiation, decreased neuronal density more importantly affecting specific cell populations such as granule cells in cerebral cortices (see Flórez, 1992 for review), and dendritic anomalies (Becker *et al.*, 1991; Marin-Padilla, 1972, 1976; Takashima *et al.*, 1994). Part of these alterations may be dependent on a genetic effect but some of them are more probably due to a reduced remodeling potential and impaired neural plasticity in DS. The molecules involved in plasticity or neural connectivity hold thus potential for being best targets for therapy.

In the search of candidate molecules for DS therapy it is interesting to note, that though most DS cases are caused by the presence of an entire extra copy of HSA-21, a small number have a "partial trisomy," resulting from an unbalanced translocation or partial duplication of the long arm of HSA-21. These infrequent cases of partial trisomy 21 have allowed the definition of the DS critical region of HSA-21 within the q22 region that includes a subset of genes that when present in three copies results in the major phenotypic features of DS, including the characteristic facial appearance, congenital heart disease, and mental retardation.

Thus, genes in the DS syndrome critical region that are shown to be dosage sensitive should be explored in good *in vivo* model systems with the goal of normalizing their dose and evaluating the impact of this normalization on specific phenotypes. An earlier step is to determine the phenotypic impact of their overexpression on *in vivo* models.

ARE THERE EVIDENCE-BASED THERAPIES IN DS?

To date most of the therapeutic approaches to DS have been based on three major streamlines: (1) in the experiences on other diseases, such as AD, that is present in almost 100% of DS patients, (2) on general unspecific nutritional-based approaches, leading to a non-targeted general amelioration, justified by the theoretically reduced risk of these approaches, or (3) on early intervention programs, that have been

effective in the short, but not in the long term. Recent advances in molecular neuroscience have begun to provide the answers to key questions in the understanding of the pathogenesis and in the identification of candidate genes that may be potentially good target molecules for therapy. Most promising in the long run, our understanding of the basic mechanisms underlying DS mental retardation has led to the hypothesis that DS is a disorder that results from disruption of postnatal or experience-dependent synaptic plasticity (see Dierssen and Ramakers, in press). Thus, early interventions offer the promise of disease-modifying strategies for use early in disease and during the whole life period, although, to address a scientific-based strategy it is necessary to clearly identify environmental modifiers for specific cognitive phenotypes and environmental factors that alter the neurobiological or behavioral phenotypes (Dierssen, 2003a).

However, there have been in the last years important advances in new therapeutic tools that may redraw our premises in mental retardation therapy, integrating genetics and neuroscience research, and codifying the notion that there's a need for evidence based therapy and translational research to identify genes linked to the disease, specifically for the cognitive symptoms, but also for drug response in these patients. However, to address the crucial question of what are the better candidate molecules for therapy, it is necessary a good definition of the neurobiological phenotype, that specifies the cognitive abilities, emotional regulation, brain-imaging profile, and other qualities is necessary, along with an accurate definition of the behavioral phenotype that classifies the expression of disease-related behaviors, including their range and frequency.

Over the years, two types of interventions have been advocated to enhance the cognitive function in DS. The first is early intervention programs to help children with DS develop their full potential. It seems likely that these programs influence the children's social skills and performance rather than affecting the underlying cognitive deficit. The second is various drugs, vitamins and minerals that have been widely claimed to increase IQ in subjects with DS. It is suggested that the biochemical imbalances and genetic metabolic deficiencies can be treated with extra quantities of vitamins and/or minerals. An example is the increased oxidative stress in DS that led to the assumption that antioxidant nutritional supplements might be beneficial in this condition. However, apart from specific treatments on older DS patients, with

few exceptions, the trials performed provide no positive evidence of drugs, vitamins and minerals enhance either cognitive function or psycho-motor development in people with DS. In view of the potential side effects of the very large doses that have been proposed by proponents of some forms of this nutritional therapy and their unproven efficacy and safety records compounded by their widespread use and ease of access, the need for large well conducted trials is clear.

PHARMACOLOGICAL TREATMENTS

To date there are almost no evidence-based pharmacological therapies in DS. Our poor knowledge of the underlying neurotransmitter system alterations, the cellular signaling events that may be disrupted or the impairments in activity-dependent structural changes underlying cognitive dysfunctions have conditioned an exploratory pharmacology, with rather poor results.

The therapies used to improve CNS function in DS can be classified in unspecific and specific CNS treatment, where nutritional, nootropic and hormone treatment could be considered as unspecific whereas specific treatment would be that specifically directed to one of the symptoms of the syndrome (see Fig. 1).

One of the most widely used family of drugs in DS have been nootropic agents, that are claimed to improve the efficiency of the higher telencephalic functions of the brain involved in cognitive processes such as learning and memory (Vernon *et al.*, 1991) in instances of brain dysfunction. These drugs are supposed to work in one of two main ways: either by increasing blood flow to the brain, or by boosting the levels of one or other of the neurotransmitters thought to play a part in learning and memory. The term "nootropic" was coined by the pharmacologist Cornelius Giurgea in the 1970s from the Greek, meaning acting on the mind. To qualify as a nootropic, a drug had to: (a) Enhance learning and memory, especially under conditions of disturbed neural metabolism resulting from a lack of oxygen, electroshock or age-related changes (b) Facilitate information flow between the cerebral hemispheres (c) Enhance the general resistance of the brain to physical and chemical injuries and (d) Be devoid of any other psychological or physiological effects.

The rationale for the use of these drugs came from stroke patients where the reduced blood flow could benefit from increasing cerebral blood flow and diminishing hypertension. The second reasoning

came from work on the neurochemical deficits in AD. One of the characteristic features of AD is progressive loss of memory. Postmortem studies of the brains of AD patients show a dramatic destruction of neurons, and particularly neurons which secrete or utilize the neurotransmitter acetylcholine. During the 1970s, research with animals also suggested that acetylcholine might be a key neurotransmitter in memory formation; for instance drugs such as scopolamine, which deplete brain acetylcholine also impair memory. In the early 1980s these observations gave birth to the cholinergic hypothesis of memory loss.

Attempts to increase the brain's supply of acetylcholine suggested the use of acetylcholinesterase (AChE) inhibitors along with food additives that are potential metabolic precursors of acetylcholine, such as choline and acetylcarnosine.

Despite the focus on the role of acetylcholine, the complex processes that underpin cognition and memory broadened the search of cognitive enhancers to include agents that interact with other neurotransmitters, including glutamate, serotonin (5-HT) and dopamine and to other agents. Experimentally, there is some evidence that calcium channel blockers,

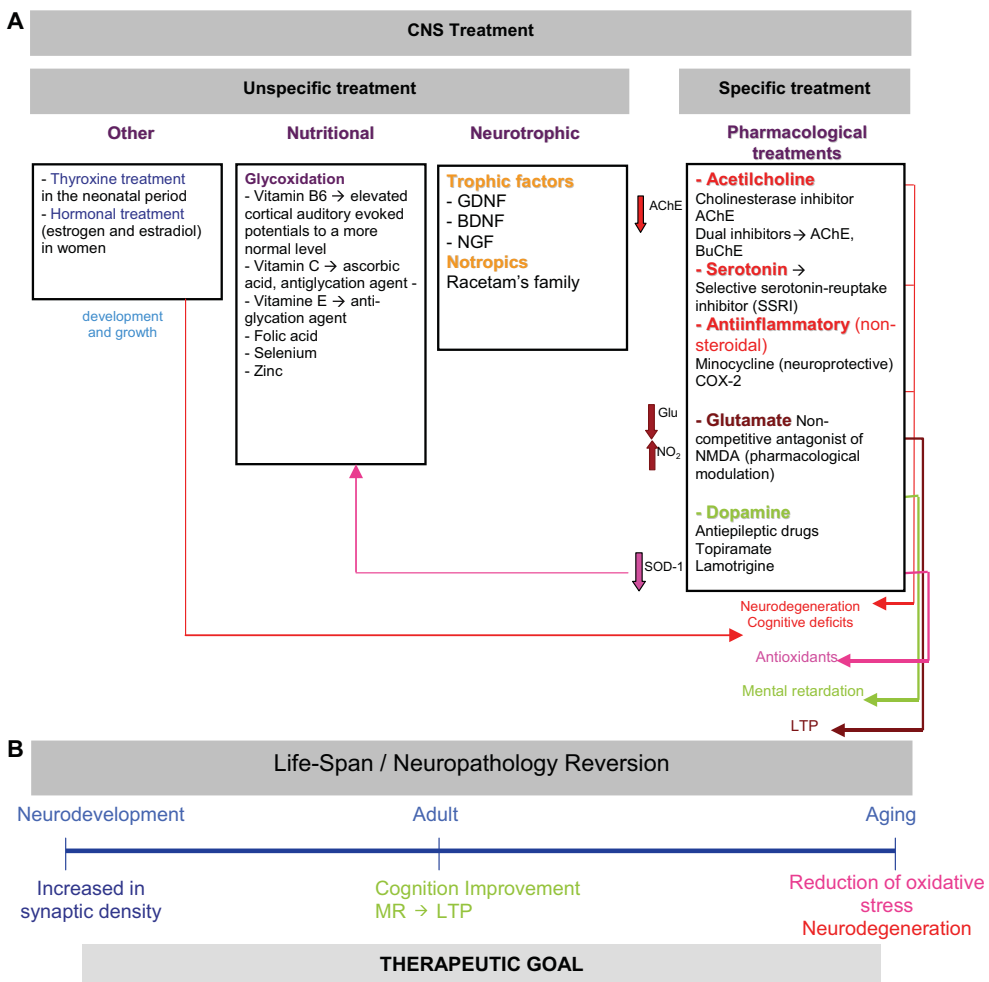


Fig. 1. Pharmacological approaches to DS. (a) CNS-directed treatments: unspecific (nutricional, neurotrophic and others) and specific (neurotransmitters). (b) Possible therapeutic targets in DS patients.

glutamate agonists, 5-HT antagonists and certain piracetam derivatives can help laboratory animals learn highly specific tasks if the agent is injected around the time of training. But in many cases, it is not clear how the drugs act in animal tests. Some may work by interfering with the molecular events leading to memory, others by affecting the animal's general level of physical activity. Testing memory in non-humans presents nearly as many ambiguities as studying it in humans.

In the racetam family, piracetam, a cyclic derivative of γ -amino butyric acid (GABA) has received the most interest for the treatment of cognitive problems in DS. In Canada, researchers studied 25 children with DS treated with piracetam in a double-blind crossover trial. However, tests of attention, learning, and neurocognitive function showed no consistent beneficial cognitive effect versus placebo.

A key stage in the molecular cascade of memory formation appears to be the opening of membrane channels through which calcium ions flow. Calcium channel blockers such as verapamil, diltiazem, nifedipine, nitrendipine and nimodipine are not only widely used to treat hypertension, and hence might affect cognition by increasing cerebral blood flow, but also block the entry of calcium ions into neurons.

In some cases the therapeutic agents used are based on specific DS brain features. This is the case of the neurotransmitter enhancer drugs, addressing specific neurochemical dysfunctions. However, the poor understanding of the synaptic dysfunction in DS has led to poor results in these therapeutic approaches. On the other hand, memory enhancement research is primarily geared toward neurodegenerative diseases, and thus many treatments in DS are based on therapies used in AD due to the genetic relationship between both diseases.

Below we outline some of the most popular therapeutic approaches that have been used in DS over the last years.

Cholinergic System

Beyond 35 years the neuropathological changes seen in DS brains are identical to those seen in sporadic AD. Life tables for DS indicate that, although survival is significantly poorer than for the general population, over half of individuals can be expected to survive into their fifties and 13.5% will still be alive at age 68 years thus increasing the possibility of the appearance of dementia. In a

comparison with other individuals with mental retardation without DS, Zigman *et al.* (1995) found that adults with DS are significantly more likely to have dementia, with odds ratios of 1.68–8.56. Genetic, neuropathological and neurochemical similarities between DS and AD have motivated the use of AD therapy in DS patients. As occur in AD, neurodegenerative changes in DS are characterized by progressive accumulation of senile plaques and neurofibrillary tangles, and have a similar regional distribution as in AD (Mann, 1988; Wisniewski *et al.*, 1985). Individuals with DS develop progressive degeneration of basal forebrain cholinergic neurons (BFCNs). This phenotype is also observed in partial trisomy 16 (Ts65Dn) mice, an animal model of DS that exhibits progressive loss of BFCNs and cognitive ability. In fact lower brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophic growth factor (NGF) protein levels in the frontal cortex may be associated with the working memory impairment observed in trisomic mice (Bimonte-Nelson *et al.*, 2003).

Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE), the enzymes that break down Acetylcholine are found in neurons and glia as well as in neuritic plaques and tangles in AD patients (Wright *et al.*, 1993). In the cortex of patients affected by AD, AChE activity decreases progressively from mild to severe stages of the disease to reach in certain brain regions only 10–15% of normal values while BuChE activity is unchanged or even increased to a maximum of 120% (Perry *et al.*, 1978). Cholinergic hypofunction is thought to contribute to dementia-related cognitive decline and remains a target of therapeutic intervention for AD. Oftentimes patients with AD have inadequate amounts of acetylcholine in the synapses between neurons. Thus, the few currently approved drugs are acetylcholinesterase inhibitors that work by boosting the effectiveness of the neurotransmitter acetylcholine, increasing the synaptic availability of the neurotransmitter. Generally, however, these drugs have only modest effects in patients with AD.

Donepezil and galantamine are selective inhibitors of AChE, whilst rivastigmine is a dual inhibitor of AChE and BChE. From the clinical point of view, the most significant therapeutic effect of cholinesterase inhibitors in AD treatment is to stabilize cognitive function and a decrease in confusion at a steady level during at least 1-year period in approximately 50% patients (Giacobini, 2004).

Cholinesterase inhibitor treatment has also been used in DS. Four published trials on a small number of patients for a period of 8–40 weeks demonstrated a decrease in confusion and improvement of cognition. One example of AChE inhibitors is donepezil therapy in patients with DS that may be more sensitive to donepezil than to other drugs and may benefit from this treatment, although they may also have more frequent adverse effects. Donepezil has been proposed to be a useful medicine for specific DS cases with severe cognitive impairment or mental retardation if the adverse effects are manageable (Kondoh *et al.*, 2005). The combination of cholinesterase inhibitors with estrogens, antioxidants, and anti-inflammatory drugs may represent a further improvement of the therapy (Capone, 2001).

However, cholinergic therapy is now not only directed to the AD associated symptoms, but also several trials have been performed in DS children. In pilot studies, improvements in global function (Kishnani *et al.*, 1999) and expressive language function (Heller *et al.*, 2003) were reported following cholinergic therapy (donepezil hydrochloride). More recently (Heller *et al.*, 2004) a significant improvement was reported in overall language performance in a small open-label clinical trial of donepezil in children with DS. The improvement was specific of selective aspects of language performance (particularly aspects of expressive language). This result is noteworthy in the context of similar findings of language improvement in autistic children treated with two different cholinesterase inhibitors, donepezil hydrochloride (Chez *et al.*, 2001), and rivastigmine (Chez *et al.*, 2004). However, these findings should be viewed as preliminary and interpreted with caution because of methodological limitations such as an extremely small sample size, lack of power for formal statistical control, repeated comparisons across a relatively short time span (16 weeks), and the lack of an untreated control group (Heller *et al.*, 2004). Taken together the results of individuals with DS and with autism suggest a relationship between language performance and the cholinergic system that extends across syndromes and that cholinergic therapy is a potential treatment for language impairment in children and adults with significant developmental delays.

Serotonergic System

Serotonin acts as a growth factor during embryogenesis, and serotonin receptor activity forms

a crucial part of the cascade of events leading to changes in brain structure. The serotonergic system plays a well-known role in integrating emotion, cognition and motor function. The serotonergic system interacts with BDNF, S100beta, and other chemical messengers, in addition to its cross talk with the GABAergic, glutamatergic, and dopaminergic neurotransmitter systems. (Sodhi *et al.*, 2004).

A large body of evidence exists on altered platelet serotonin uptake and metabolism in DS. There is a specific 5-HT dysfunction found in basal ganglia (caudate nucleus) of adult DS, which is not present in AD (Seidl *et al.*, 1999). Serotonin transporters (SERTs) are presynaptic proteins specialized for the clearance of serotonin from the synaptic cleft. Besides, dysregulation of SERTs expression have been reported in various complex behavioral traits and disorders including, neurodegenerative disorders. Frontal cortex SERT is significantly increased in DS, whereas in cerebellum, no significant difference with control population has been observed. Moreover, a region-specific alteration in SERT expression may exist in DS with AD-like pathology (Gulesserian *et al.*, 2000). As little is known about the status of serotonergic synaptic markers in DS brain, the findings may contribute to an effort made to delineate the underlying causes of serotonergic dysfunction in DS and the quest for therapeutic strategies.

In fact treatment with selective serotonin-reuptake inhibitor (SSRI) medication has been used in DS for cases where non-cognitive symptoms were prominent and included aggression, social withdrawal, and depressive, apathetic and compulsive behaviors. Non-cognitive symptoms are a cardinal feature of functional decline in adults with DS and may represent either depression or AD. In some patients, the symptoms respond well to SSRI agents with concomitant improvement in daily function (Geldmacher *et al.*, 1997). Similar trials have been performed with a low dose antidepressant (trazodone) combined a serotonin-enhancing diet to reduce aggression and severe self-injurious behavior in some adult cases with DS (Geyde, 1990, 1991).

Pharmacological Modulation of NMDA

Synaptic transmission mediated by the NMDA receptor has been implicated in many physiological functions, including synaptic plasticity, long term potentiation, information storage and development, as well as a number of pathological conditions such

as AD (Scheuer *et al.*, 1996) and Parkinson disease, AIDS, epilepsy, focal and global ischemia and stroke.

Since the proposal that excessive glutamatergic stimulation could be responsible for neuronal suffering and death, excitotoxicity and glutamate uptake deficits have been repeatedly confirmed to play a key role in the pathogenesis of different neurological diseases. Therefore, it is conceivable that assessing the glutamatergic system function directly in patients could be extremely useful for optimization of therapy. A possibility is offered by assessing glutamate levels in biological fluids, such as plasma and CSF, but the possibility of directly assessing glutamatergic functional parameters, such as amino acid reuptake, would probably mirror closely the actual excitotoxic damage operative in each patient. Findings obtained in peripheral *ex vivo* cells, such as platelets and fibroblasts, both displaying a functional glutamate reuptake system, in glutamate uptake in peripheral cells of AD and DS. In the Ts16 mouse, a model for DS, abnormal glutamate mediated responses during cortical development with a possible impact on neuronal migration at critical stages (Siarey *et al.*, 1997) have been reported. The data indicate that oxidative stress may play a key role in these phenotypes.

Antiinflammatory (Non-Steroidal) Agents

DS human brains exhibit activated microglia and elevated levels of proinflammatory cytokines (Griffin *et al.*, 1989) that have been suggested to play an important role in DS associated AD-like pathology (McGeer and McGeer, 1995, 2001; Schubert *et al.*, 2001).

In mice, antiinflammatory non-steroidals have demonstrated neuroprotective properties in immunotoxic BFCNs lesions and improve memory (Mufson *et al.*, 1993). Minocycline (semisynthetic tetracycline with antiinflammatory properties) is an established antiinflammatory and neuroprotective drug and may provide a novel approach to treat specific AD-like pathologies (Hunter *et al.*, 2004a). Recently it has been reported that minocycline treatment inhibits microglial activation, prevents progressive BFCN decline in the DS mouse model, Ts65Dn, and markedly improves performance on a working and reference memory task.

However, inflammatory alterations may also occur during the whole life-span of DS patients since some candidate genes for DS, such as DSCR1 are regulated by vascular endothelial growth factor (VEGF) in endothelial cells. Consistent with an

antagonistic function on calcineurin (CnA) signaling, expression of DSCR1 in endothelial cells blocked dephosphorylation, nuclear translocation, and activity of nuclear factor of activated T cell (NFAT), a transcription factor involved in mediating CnA signaling. The negative regulatory feedback loop between DSCR1 and CnA signaling in endothelial cells may represent a potential molecular mechanism underlying the expression of inflammatory genes following activation of endothelial cells (Hesser *et al.*, 2004).

In the CNS an activation of pro-inflammatory cytokines is associated with cognitive disturbances. This process is mediated by prostaglandins and cyclooxygenase-2 (COX-2). Thus, COX-2 inhibitors have been suggested to show beneficial effects in disorders associated with cognitive disturbance, although clinical effects on cognition have not been shown, but they may open interesting therapeutic possibilities for DS (Muller *et al.*, 2005).

Antiepileptic Drugs

Although seizures and epilepsy were not mentioned in the original description of DS, the prevalence of seizures in individuals with DS is now known to be higher than in the general population but lower than in patients with some other types of mental retardation. Reported rates of epilepsy in DS range from 1 to 13%. The increased seizure susceptibility in DS has been attributed to inherent structural anomalies of the brain or to medical complications associated, such as cardiovascular abnormalities and recurrent infections. Several authors suggest that an interplay between inherent structural brain anomalies in DS, such as fewer inhibitory interneurons, decreased neuronal density, abnormal neuronal lamination, persistence of dendrites with fetal morphology, or primitive synaptic profiles may play a role in epileptogenesis (Becker, 1991; Romano *et al.*, 1990; Stafstrom, 1993; Stafstrom *et al.*, 1988). Altered membrane potassium permeability, which may lead to a decreased voltage threshold for spike generation, smaller hyperpolarization following spikes, or increased action potential duration, have also been documented in patients with DS. Indeed, in the mouse model of trisomy 16, the experimental model of DS, a rapid spike rise and fall was recorded from the dorsal root ganglia neurons (Holtzman *et al.*, 1992). Thus, it may be argued that the pharmacological control of epileptic activity in brain would have beneficial effects on cognition in DS

patients. In humans, topiramate is associated with improvement in seizure severity and alertness in this series and may be useful as adjunctive therapy in patients with mixed seizures, mental retardation, and developmental disabilities (Singh *et al.*, 2002). Similarly, adjunctive use of lamotrigine in patients with mental retardation and refractory epilepsy is associated with decreases in seizure frequency and improvements in clinical and behavioral status (McKee *et al.*, 2003).

NON-SPECIFIC TREATMENT

Nutritional Therapies

Nutritional therapies have been argued to restore cognitive function and implement newborn development in DS, based on the fact that DS is characterized by metabolic disturbances. Amino acid pathways abnormalities and defective oxidative balance are the most common metabolic problems in DS. However, there is no consensus on the efficacy of these treatments. Different trials with specific nutritional regimes support the usefulness of a nutritional supplementation with amino acids, vitamins and polyunsaturated fatty acids, along with an absence of side effects (Ciaccio *et al.*, 2003; Thiel and Fowkes, 2005) for some of the pathological signs of DS. However, there is no positive evidence that any combination of drugs, vitamins and minerals enhance either cognitive function or psychomotor development in people with DS (Salman, 2002), and some authors have questioned the efficacy of multi-nutrients in DS (Harrell *et al.*, 1981; Prues *et al.*, 1989). In some instances, an effort has been made to find evidence based therapies, such as in the early accumulation of advanced glycation end-products, that appears to finally result in dementia in much of the DS population, and for which nutritional therapy may be of use.

In DS, SOD-1 gene is approximately 50% overexpressed (Anneren *et al.*, 1993; Sinet, 1982), so that S100B and superoxide dismutase, SOD (most probably SOD-1) in amniotic fluid have been proposed as additional parameters for prenatal screening of trisomy 21 (Netto *et al.*, 2004). These two proteins have been proposed as candidates for neurodegenerative features of DS, and some of the cognitive impairments in this disease are likely due to post-natal hydrogen peroxide-mediated oxidative stress caused by overexpression of the *SOD-1* gene. However, part of the disability may also be due to early accumulation of advanced glycation

end-product that may play an adverse role in prenatal and postnatal brain development. Moreover, elevated levels of cytosolic SOD decrease the levels of superoxide (the enzyme's substrate) and increase the levels of hydrogen peroxide (enzyme's metabolite, end-product or output). Increased levels of hydrogen peroxide might induce the production of glutathione peroxidase, a selenium-dependent enzyme, thereby increasing selenium requirements (Antila *et al.*, 1990).

For these reasons the prophylactic use of anti-glycation nutrients has been proposed (Thiel and Fowkes, 2005). Essential nutrients such as folate, vitamin B6, vitamin C, vitamin E, selenium, and zinc, as well as alpha-lipoic acid and carnosine Acetyl-L-carnitine, aminoguanidine, cysteine, and N-acetylcysteine may possibly be partially preventive, although these last compounds may have possible safety concerns for the DS population. The rationale would be that if nutritional factors begin prenatally, in early infancy, or later they may prevent or delay the onset of dementia.

However, it should be noted that the relationship between overexpression of SOD and DS patients symptoms has been questioned, arguing that an extra copy of this gene may even protect from apoptosis (Turrens, 2001). Sebastia *et al.* (2004) suggested that *SOD1* overexpression has beneficial effects on astrocytes, as it does in other systems with similar high disposal of hydroperoxides. In fact, in addition to a higher enzymatic activity of SOD1, cultures of trisomic DS mice astrocytes showed slightly higher glutathione reductase activity than euploid cultures. The fact that DS astrocytes protected neurons from an oxidative injury *in vitro* better than euploid astrocytes, may be relevant to DS neuropathology.

Hormone Treatments

In DS there is a high incidence of overt or sub-clinical hypothyroidism as well as some immunological defects, early thymic involution associated to low serum zinc levels. Zinc deficiency has been shown to impair immune response and growth rate (Bucci *et al.*, 1999) whereas dietary zinc supplementation has been reported to transiently improve thymic function (Napolitano *et al.*, 1990). Thyroxine treatment may improve development and growth of young DS children and has been proposed as a therapeutic tool to maximize the early development and growth in DS neonates (van Trotsenburg *et al.*, 2005).

The cystathionine β -synthase gene (CBS) on chromosome 21q22.3 is over-expressed in individuals

with trisomy 21 and encodes for a pyridoxal 5-phosphate-dependent enzyme that condenses homocysteine and serine to form cystathionine. Another gene on chromosome 21q22.3 (RFC1 or SLC19A1) encodes for the folate carrier, responsible for the internalization of 5-methyltetrahydrofolate in cells. Homocysteine is situated at a critical regulatory branch point in the sulfur metabolism produced by cellular demethylation of dietary methionine. It can be re-methylated to methionine by the transfer of the methyl group of methyltetrahydrofolate, which requires methionine synthase (5-methyltetrahydrofolate-homocysteine S-methyltransferase) with both vitamin B-12 and S-adenosylmethionine as cofactors, or can be converted to cysteine in the trans-sulfuration pathway, which requires CBS and vitamin B-6 as cofactors. Lower plasma total homocysteine (tHcy) concentrations are consistent with a functional folate deficiency resulting from CBS over-expression and higher enzyme activity. For these reasons, nutritional formulas that contain vitamin B and folic acid supplementation are promoted to correct these metabolic pathways and to prevent functional folate deficiency in DS. However, there are no significant differences in fasting blood tHcy concentrations between healthy controls and adult trisomy 21 patients that justify B vitamin supplementation have been found (Fillon-Emery *et al.*, 2004).

Estrogens exhibit trophic properties on BFCNs and hippocampal dendrites (Granhölm, 2000) in DS mouse models and have antioxidant properties (Behl *et al.*, 2000). Hunter *et al.* (2004a) reported that estradiol treatment increased BFCN cell size and number in the Ts65Dn mouse. Moreover, women with DS undergo early menopause (Schupf *et al.*, 1997), which is correlated with memory decline (Patel *et al.*, 2001). Estrogens may thus play a role in the modulation of physiological processes likely to be associated with the alterations that occur during aging and neurodegenerative disorders and have been claimed as possible therapies in older DS women. However, in pharmacological trials performed in the Ts65Dn mice model of DS, estrogen treatment prior to testing does not improve their cognitive performance in an increasing working memory load task (Hunter *et al.*, 2004b).

EARLY INTERVENTION IN DS

Although early intervention for children with DS is universally accepted, the extent of the benefits continues to be evaluated. Positive short-term effects

of early intervention for children with DS are well recognized, whereas long-term effects are less documented (Guralnick, 1998; Gibson and Harris, 1988). Early implementation of special education programs leads to improved cognitive abilities in individuals with DS (Connolly *et al.*, 1993) but the cognitive improvements achieved are limited, and temporary. The neural correlates of the temporary effects are unknown. Early experience is known to alter both behavior and brain structure. In animal models environmental enrichment (EE) is associated with morphological, physiological and behavioral consequences. Morphological changes include increased cortical weight and thickness, alterations in cortical connectivity consisting of a larger number of synapses per neuron, lower neuronal density, increased dendritic branching and length, greater numbers of dendritic spines, increased size and number of synaptic junctions and increased neurogenesis in specific areas. Many of these changes are consistent with enrichment-induced changes in the expression of genes involved in neuronal structure, synaptic signaling and plasticity, facilitation of hippocampal responses, such as long-term synaptic potentiation and increases in protein kinase C. These morphological and physiological effects may account for the EE induced behavioral changes, including spontaneous and exploratory activity, enhanced perceptive abilities, better performance and more efficient learning, documented in various cognitive and behavioral tasks. The possibility to replicate this approach in an animal model of DS has offered the advantage of separately analyzing the many factors possibly involved in the EE stimulation. Post-weaning EE had a positive effect on behavioral performance and learning abilities of DS mouse model Ts65Dn compared with their control non-trisomic littermates, specially marked on working and reference memories (Martinez-Cue *et al.*, 2002). However, environmental enrichment had little effect on pyramidal cell structure in Ts65Dn mice, suggesting that behavioral deficits demonstrated in the Ts65Dn model could be attributed to abnormal circuit development and, consequently, reduced complexity in cortical circuitry (Dierssen *et al.*, 2003b).

In humans, Spiker and Hopmann (1997) summarized the findings related to early intervention in DS and concluded that (a) children with more significant delays initially showed the slowest developmental progress, (b) the degree of early intervention participation was not a significant

predictor of subsequent child mental age. For some groups such as initially highly stressed and families with low income, more intensive early intervention was related to less improvement in development in the children and increased stress in the mothers.

There has been much interest in the study of the cognitive abilities and profiles and the decline in developmental rate of children with DS that received early intervention. Wishart (1995) described a growing use of avoidance strategies when faced with cognitive challenges, poor use of existing problem-solving skills, failure to consolidate newly acquired cognitive skills, and increasing reluctance to take the initiative in learning in children with DS. Of additional concern was poor performance on developmental assessments that was believed to be due to deficits in motivation. Early intervention for DS has showed short-term benefits in fine motor skills and simple social repertoire, but conflicting evidence in support of benefits in gross motor, linguistic and cognitive/academic domains. In some areas the intervention program should be specifically developed. Regarding language development and abilities, Miller *et al.* (1995) recommended that intervention methods focus on oral motor integrity during the early periods of development since the vocabulary tends to increase slower than in a normal child. Thus, it has been recommended that: (1) a critical review of the present practices is faced; (2) individual differences independent of DS features should be taken into account; and (3) care delivery systems should be multidisciplinary. During the past years, successful experiences have developed in Europe for entrance into the educational system within the first years of life to stimulate development, inclusion in the typical classroom with support, and help for employment and adult living situations.

GENE TRANSFER APPROACHES TO TREAT NEUROLOGICAL DISORDERS

Gene therapy holds great promise for increasing the specificity of treatments while reducing unnecessary or dangerous side effects. In the last 10 years, gene therapy for neurological disorders has moved from the concept to pre-clinical studies and finally to clinical reality. Phase I clinical studies for AD, Canavan and Parkinson's diseases have been already initiated and they should provide valuable data on the use of gene-based therapeutic approaches for the treatment of neurological disorders (reviewed in Deglon and Hantraye, 2005).

The basic concept of gene therapy is very simple: introduce genetic material that either its product or the inhibition of an endogenous protein should cure or slow down the progression of a disease. This approach requires a technology capable of gene transfer to the target organ. Highly efficient viral systems, such as adenovirus, adenoassociated virus and lentivirus have shown to deliver genes into mature neurons both *in vivo* and *in vitro*, enabling development of active gene therapies for brain diseases (Davidson and Breakefield, 2003). Liposomes also provide the possibility of significant delivery to the CNS.

Gene Delivery Vectors

Lentivirus are RNA enveloped virus, members of the retroviral family, derived from the human immunodeficiency virus or non-human virus such as feline, equine, simian or bovine. They are attractive vectors in the context of their ability to transduce non-dividing cells, such as neurons and to express transgenes for a long period. Moreover, minimal host immune response has been reported. However there is a major concern to the fact that they are integrative virus with potential for oncogenesis (Delenda, 2004).

Adenoviruses are non-enveloped icosahedral DNA viruses of 90 nm diameter. They are associated with benign pathologies in humans. The most widely used serotype Ad5 causes infections of the respiratory tract. As gene transfer vehicles they are very efficient in transducing quiescent differentiated cells. The major drawback of the current vectors is that they trigger an immune response and this limits long-term gene expression. Although the use of neuron-specific promoters can partially overcome this limitation and mediate sustained expression in neurons (Kugler *et al.*, 2003).

Adenoassociated viruses (AAV) are small non-enveloped virus of 20–24 nm of diameter that has not been associated with a disease in humans. They are single-stranded DNA viruses and eight different serotypes have been identified. AAV2 serotype 2 infects neurons preferentially, probably through the interaction of viral capsid proteins with heparan sulphate proteoglycans, although not all the neurons are equally well transduced. AAV5 has been shown to be very efficient in transducing Purkinje cells but no granular cells in the cerebellum. Thus, each serotype has a distinct tropism when injected into the brain. They can transport genes but also expression of shRNAs has been shown to be feasible (Xia *et al.*,

2002). Limitations of AAV vectors include a small cloning capacity and a delayed transgene expression. In addition to the neuronal tropism the long term expression, and the limited immune response of the virus make them very attractive for CNS applications (Okada *et al.*, 2002).

Liposomes are large and complex molecules derived from phospholipids modifications with an aqueous phase inside that can entrap drugs, and large DNA or RNA fragments (Torchilin, 2005). They are biocompatible, but they have poor efficient gene transfer capacity. They are rapidly remove from circulation and strategies aimed to reduce this problem, such as the use of pegylated immunoliposomes has shown the feasibility of achieving knockdown gene expression after intravenous administration (Zhang *et al.*, 2003b).

Gene Specific Downregulation

A broad number of CNS disorders are consequence of the overexpression of particular genes. The emergence of the powerful RNA interference (RNAi) technology offers new opportunities to specifically down-regulate disease-related transcripts.

RNA interference

From the discovery of RNAi it was rapidly proven that its ability in knocking-down gene expression was more powerful than other already existing techniques such as the use of antisense oligomers, aptamers or ribozymes. The process of RNAi, was first described in *C. Elegans* in 1998, by showing that specific gene silencing was achieved after injecting a double-stranded RNA homologous to the target gene (Fire *et al.*, 1998). In mammalian systems, it was first thought that this mechanism will not be occurring because it was known that dsRNA molecules, coming from viral infections trigger the interferon pathway which results in the global shutdown of protein synthesis (McManus and Sharp, 2002). However, in 2001 several studies showed that chemically synthesized short dsRNA molecules of 21–22 nucleotides—named small interfering RNAs (siRNAs)—target mammalian genes by RNAi while evading the interferon response (Caplen *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001). Soon after, another technical advance came with the demonstration that the expression of siRNA in the form of short hairpin RNAs (shRNAs), which contains a fold-back stem-loop structure, could also induce target-gene silencing

(Paddison *et al.*, 2002). Then, the possibility of achieving a longer and more stable inhibition of expression emerged, opening the door to a wide therapeutic use of the siRNAs by using specifically delivery vectors to target the desired tissue or organ.

The mechanism of RNA interference is not completely understood although some general facts are known. It has been shown that siRNAs once introduced into the cells, either as a duplex of short oligonucleotides or as short hairpins using viral expressing vectors are incorporated into a protein complex, known as the RNA-induced silencing complex (RISC). The antisense strand of the duplex siRNA guides the RISC to the homologous mRNA, where the RISC-associated endoribonuclease will cleave the target mRNA (Zamore *et al.*, 2000).

RNAi Targeting CNS Genes

RNAi has been widely used to study gene function in fundamental neurobiological processes such as intracellular signaling, embryonic development, programmed cell death, neural plasticity, axon guidance or membrane trafficking (Genc *et al.*, 2004).

Interestingly the therapeutic potential of RNAi for neurological disorders that rang from viral infections to genetic diseases has already started. Several examples on dominantly inherited neurodegenerative pathologies treated by RNAi approaches have already shown their therapeutic potential. *In vitro* studies of RNAi targeting specific expanded alleles of polyglutamine disorders or specific alleles with small deletions such as in inherited dystonia have been shown to be feasible (Miller *et al.*, 2003; Gonzalez-Alegre *et al.*, 2003). Moreover, specific silencing of a pathogenic mutant acetylcholine receptor subunit that causes a slow channel congenital myasthenia syndrome was achieved by transfecting siRNAs or shRNAs into HEK 293 cells (Abdelgany *et al.*, 2003). The inhibition of the Tau mutant allele (V337M) and the amyloid precursor protein (APP) mutated allele, have shown that RNAi can be an efficient strategy for targeting AD genes (Miller *et al.*, 2004).

Studies concerning the *in vivo* delivery of siRNAs to the CNS has been proven to be feasible by a variety of viral and non-viral vectors (Hommel *et al.*, 2003; Thakker *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003a). Moreover, several examples of RNAi therapies resulting in therapeutic benefit have been reported. Specific inhibition of the Agouti-related peptide, the AGRP, by direct injection of both

siRNA and liposome-mediated plasmids, into the arquate nucleus of the hypothalamus, leads to an increase in the metabolic rate and to a decrease in the animal body weight (Makimura *et al.*, 2002). Interestingly, the attenuation of the alpha2A adrenergic receptor on neonatal rat brain by direct injection of siRNAs into the brainstem was shown to reduce anxiety responses (Shishkina *et al.*, 2004). This was the first evidence of long-term effects as a consequence of gene inhibition at neonatal stages because neurochemical and behavioral alterations were still detected in the adults. In another study, intrathecal infusion into a rat model for neuropathic pain of modified siRNA oligonucleotides targeting P2X3, a cation-channel that plays a role in inflammatory pain signaling, provided pain relief (Dorn *et al.*, 2004). Improvements in cellular and behavioral characteristics of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) mice after intracerebellar injection of AAV expressing shRNAs against the transgenic human ataxin-1 have been observed (Xia *et al.*, 2004). Very recently, two papers reported the silencing of SOD1 in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis ALS. In both studies, shRNAs were delivered by lentivirus but following two different routes of administration. Direct injections to the spinal cord reduced SOD1 expression leading to a retardation in the onset and in the progression rate of the disease (Raoul *et al.*, 2005). Intramuscular injections in specific muscle groups showed reduction in SOD1 expression and improved motor performance, resulting in a considerable delay in the onset of ALS symptoms (Ralph *et al.*, 2005).

All these preclinical studies support the idea that RNAi can be a powerful therapeutically approach to target genes involved in CNS pathology. A first clinical trial using RNAi already started in November last year for macular degeneration, a debilitating eye disorder that leads to blindness. This trial together with the ones announced to begin next year for asthma and Huntington's diseases will address whether RNAi causes therapeutic benefit in humans, or unpredictable side effects.

PROSPECTS FOR DS

Currently, there are no efficacious biomedical treatments for the central nervous system-associated impairments in DS. To develop novel therapeutic strategies, the effects of gene dosage imbalance needs to be understood within the framework of *in vivo* models that allow the integration on higher CNS

function with structural and molecular levels. These findings would be the first step in delineating best candidate genes and subsequently to select the more interesting target molecules.

Gene therapy for DS is probably years down the road. However, as we begin to understand the function of specific genes and we can identify the contribution of individual genes to the overall phenotype thinking on partial gene therapy for specific defects might be a good approach. In DS, there is an overexpression of a relative number of genes thus reduction of gene expression in particular genes might modify the course of the disease. All the potential that RNA interference has already shown for different neurological disorders and the availability of gene transfer vectors with neuronal tropism holds great promise to begin to think in silencing candidate overexpressed genes in DS and search for correction of particular phenotypes. Perhaps to reduce or normalize the transcript levels of dosage sensitive genes in specific brain areas might be a good way to start.

ACKNOWLEDGMENTS

C.F. and M.D. have funded projects from Jérôme Lejeune Foundation (JLF). G.A. is supported by JLF. Other funding supporting the investigation are FIS PI041559, CIEN Foundation, MCYT (SAF2002-00799), EU QLGI-CT-2002-00816

REFERENCES

- Abdelgany, A., Wood, M., and Beeson, D. (2003). Allele-specific silencing of a pathogenic mutant acetylcholine receptor subunit by RNA interference. *Human mol. genet.* **12**:2637-2644.
- Anneren, G., and Edman, B. (1993). Down syndrome-a gene dosage disease caused by trisomy of genes within a small segment of the long arm of chromosome 21, exemplified by the study of the effects from the superoxide type-1 (SOD-1) gene. *AMPS Suppl.* **40**:71-79.
- Antila, E., Norberg, U. R., Syvaaja, E. L., and Wetermarck, T. (eds.), (1990). Selenium therapy in down syndrome: a theory and clinical trial Antioxidants in therapy and preventative medicine. New York: Plenum Press, pp. 183-186
- Becker, L. E., Armstrong, D. L., and Chan, F. (1986). Dendritic atrophy in children with Down's syndrome. *Annals neurol.* **20**:520-526.
- Becker, L., Mito, T., Takashima, S., and Onodera, K. (1991). Growth and development of the brain in Down syndrome. *Progress Clin. Biol. Res.* **373**:133-152.
- Behl, C., Moosman, B., Manthey, D., and Heck, S. (2000). The female sex hormone estrogen as neuroprotectant: activities at various levels. In: Neuronal and cognitive effects of estrogen. Chichester, Wiley (Novartis Foundation Symposium, 230), pp. 21-38
- Benavides-Piccione, R., Ballesteros-Yanez, I., Martínezde Lagran, M., Elston, G., Estivill, X., Fillat, C., Defelipe, J., and

- Dierssen, M. (2004). On dendrites in Down syndrome and DS murine models: a spiny way to learn. *Progress Neurobiol.* **74**:111–126.
- Bimonte-Nelson, H. A., Hunter, C. L., Nelson, M. E., and Granholm, A. C. (2003). Frontal cortex BDNF levels correlate with working memory in an animal model of Down syndrome. *Behav. Brain Res.* **139**:47–57.
- Bucci, I., Napolitano, G., Giuliani, C., Lio, S., Minnucci, A., Di Giacomo, F., Calabrese, G., Sabatino, G., Palka, G., and Monaco, F. (1999). Zinc sulfate supplementation improves thyroid function in hypozincemic Down children. *Biol. Trace Element Res.* **67**:257–268.
- Caplen, N. J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., and Morgan, R. A. (2001). Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **98**:9742–9747.
- Capone, G. T. (2001). Down Syndrome: Advances in Molecular Biology and the Neurosciences. *J. Develop. Behav. Pediatrics: JDBP* **22**:40–59.
- Chez, M., Tremb, R., Nowinski, C., and Field-Chez, M. (2001). Double-blinded placebo-controlled aricept study in children with autistic spectrum disorder. *Annals Neurol.* **49**:95–96.
- Chez, M., Aimonovitch, M., Buchanan, T., Mrazek, S., and Tremb, R. (2004). Treating autistic spectrum disorders in children: Utility of the cholinesterase inhibitor rivastigmine tartrate. *J. Child Neurol.* **19**:165–169.
- Ciaccio, M., Piccione, M., Giuffrè, M., Macaione, V., Vocca, L., Bono, A., and Corsello, G. (2003). Aminoacid profile and oxidative status in children affected by Down syndrome before and after supplementary nutritional treatment. *The Ital. J. Biochem.* **52**:72–79.
- Connolly, B. H., Morgan, S. B., Russell, F. F., and Fulliton, W. L. (1993). A longitudinal study of children with Down Syndrome who experienced early intervention programming. *Phys. Ther.* **73**:170–181.
- Davidson, B. L., and Breakefield, X. O. (2003). Viral vectors for gene delivery to the nervous system. *Nature Rev.: Neurosci.* **4**:353–364.
- Deglon, N., and Hantraye, P. (2005). Viral vectors as tools to model and treat neurodegenerative disorders. *The J. Gene Med.* **5**:123–128.
- Delenda, C. (2004). Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *The J. Gene Med.* **6**:S125–138.
- Dierssen, M. (2003a). Special interest section—Down's syndrome: postgenomic approaches to neurobiological problems. *Genes, Brain, Behavior* **2**:152–155.
- Dierssen, M., Benavides-Piccione, R., Martínez-Cue, C., Estivill, X., Florez, J., Elston, G. N., and DeFelipe, J. (2003b). Alterations of neocortical pyramidal cell phenotype in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: effects of environmental enrichment. *Cerebral Cortex* **13**:758–764.
- Dierssen, M., and Ramakers, G. Dendritic pathology in mental retardation: from molecular genetics to neurobiology. *Genes, Brain, Behavior*, in press.
- Dorn, G., Patel, S., Wotherspoon, G., Hemmings-Mieszczyk, M., Barclay, J., and Natt, F. J. (2004). siRNA relieves chronic neuropathic pain. *Nucleic Acids Res.* **32**:e49.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Develop.* **15**:188–200.
- Fillon-Emery, N., Chango, A., Mircher, C., Barbé, F., Bléhaut, H., Herbeth, B., Rosenblatt, D. S., Réthoré, M. O., Lambert, D., and Nicolas, J. P. (2004). Homocysteine concentrations in adults with trisomy 21: effect of B vitamins and genetic polymorphisms 1–4. *The Am. J. Clin. Nutrition* **80**:1551–1557.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**:806–811.
- Florez, J. (1992). Neurologic abnormalities. In S. M. Pueschel and J. K. Pueschel (eds.) *Biomedical Concerns in Persons with Down Syndrome*. Baltimore: Paul H. Brookes Pub., pp. 159–173.
- Geldmacher, D. S., Lerner, A. J., Voci, J. M., Noelker, E. A., Somple, L. C., and Whitehouse, P. J. (1997). Treatment of functional decline in adults with Down syndrome using selective serotonin-reuptake inhibitor drugs. *J. Geriatric Psychiatry Neurol.* **10**:99–104.
- Gedy, A. (1990). Dietary increase in serotonin reduces self-injurious behaviour in a Down's syndrome adult. *J. Mental Deficiency Res.* **34**:195–203.
- Gedy, A. (1991). Serotonergic treatment for aggression in a Down's syndrome adult showing signs of Alzheimer's disease. *J. Mental Deficiency Res.* **35**:247–258.
- Genc, S., Koroglu, T. F., and Genc, K. (2004). RNA interference in neuroscience. *Brain Res. Mol Brain Res.* **132**:260–270.
- Giacobini, E. (2004). Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol. Res.* **50**:433–440.
- Gibson, D., and Harris, A. (1988). Aggregated early intervention effects for Down's syndrome persons: patterning and longevity of benefits. *J. Mental Deficiency Res.* **32**:1–17.
- Gonzalez-Alegre, P., Millar, V. M., Davidson, B. L., and Paulson, H. L. (2003). Toward therapy for DYT1 dystonia: allele-specific silencing of mutant TorsinA. *Annals Neurol.* **53**:781–787.
- Granholt, A. C. (2000). Oestrogen and nerve growth factor-neuroprotection and repair in Alzheimer's disease. *Expert Opinion Invest. Drugs* **9**:685–694.
- Griffin, W. S., Stanley, L. C., Ling, C., White, L., Machead, V., Perrot, L. J., White, C. L., and Araoz, C. (1989). Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **86**:7611–7615.
- Gulesserian, T., Engidawork, E., Cairns, N., and Lubec, G. (2000). Increased protein levels of serotonin transporter in frontal cortex of patients with Down syndrome. *Neurosci. Lett.* **296**:53–57.
- Guralnick, M. J. (1998). Effectiveness of early intervention for vulnerable children: A developmental perspective. *Am. J. Mental Retard.* **102**:319–345.
- Harrell, R. F., Capp, R. H., Davis, D. R., Peerless, J., and Ravitz, L. R. (1981). Can nutritional supplements help mentally retarded children? *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **78**:574–578.
- Heller, J. H., Spiridigliozzi, G. A., Sullivan, J. A., Doraiswamy, P. M., Krishnan, R. R., and Kishnani, P. S. (2003). Donepezil for the treatment of language deficits in adults with Down syndrome: A preliminary 24-week open trial. *Am. J. Med. Genet.* **116**:111–116.
- Heller, J. H., Spiridigliozzi, G. A., Doraiswamy, P. M., Sullivan, J. A., Crissman, B. G., and Kishnani, P. S. (2004). Donepezil effects on language in children with Down syndrome: results of the first 22-week pilot clinical trial. *Am. J. Med. Genet.* **130**:325–326.
- Hesser, B. A., Liang, X. H., Camenisch, G., Yang, S., Lewin, D. A., Scheller, R., Ferrara, N., and Gerber, H. P. (2004). Down syndrome critical region protein 1 (DSCR1), a novel VEGF target gene that regulates expression of inflammatory markers on activated endothelial cells. *Blood* **104**:149–158.
- Holtzman, D. M., Bayne, R. M., Li, Y., Khosrovi, H., Berger, C. N., Epstein, C. J., and Mobley, W. C. (1992). Dysregulation of gene expression in mouse trisomy 16, an animal model of Down syndrome. *The EMBO J.* **11**:619–627.
- Hommel, J. D., Sears, R. M., Georgescu, D., Simmons, D. L., and DiLeone, R. J. (2003). Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat. Med.* **9**:1539–1544.

- Hunter, C. L., Bachman, D., and Granholm, A. C. (2004a). Minocycline Prevents Cholinergic Loss in a Mouse Model of Down's Syndrome. *Annals Neurol.* **56**:675-688.
- Hunter, C. L., Bimonte-Nelson, H. A., Nelson, M., Eckman, C. B., and Granholm, A. C. (2004b). Behavioral and neurobiological markers of Alzheimer's disease in Ts65Dn mice: effects of estrogen. *Neurobiol. Aging* **25**:873-888.
- Kishnani, P. S., Sullivan, J. A., Walter, B. K., Spiridigliozzi, G. A., Doraiswamy, P. M., and Krishnan, R. R. (1999). Cholinergic therapy for Down's syndrome. *Lancet* **353**:1064-1065.
- Kondoh, T., Amamoto, N., Doi, T., Hamada, H., Ogawa, Y., Nakashima, M., Sasaki, H., Aikawa, K., Tanaka, T., Aoki, M., Harada, J., and Moriuchi, H. (2005). Dramatic Improvement in Down Syndrome-Associated Cognitive Impairment with Donepezil. *The Annals Pharmacotherapy* **39**:563-566.
- Kugler, S., Kilic, E., and Bahr, M. (2003). Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. *Gene Therapy* **10**:337-347.
- Makimura, H., Mizuno, T. M., Mastaitis, J. W., Agami, R., and Mobbs, C. V. (2002). Reducing hypothalamic AGRP by RNA interference increases metabolic rate and decreases body weight without influencing food intake. *BMC Neurosci.* **7**:3-18.
- Mann, D. M. (1988). Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Histol. Histopathol.* **13**:125-137.
- Marin-Padilla, M. (1972). Structural abnormalities of the cerebral cortex in human chromosomal aberrations: a Golgi study. *Brain Res.* **44**:625-629.
- Marin-Padilla, M. (1976). Pyramidal cell abnormalities in the motor cortex of a child with Down's syndrome. A golgi study. *The J. Comp. Neurol.* **167**:63-81.
- Martinez-Cue, C., Baamonde, C., Lumbreras, M., Paz, J., Davison, M. T., Schmidt, C., Dierssen, M., and Florez, J. (2002). Differential effects of environmental enrichment on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behav. Brain Res.* **134**:185-200.
- McGeer, P. L., and McGeer, E. G. (1995). The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Behav. Brain Res.* **21**:195-218.
- McGeer, E. G., and McGeer, P. L. (2001). Innate immunity in Alzheimer's disease: a model for local inflammatory reactions. *Mol. Interventions* **1**:22-29.
- McKee, J. R., Sunder, T. R., FineSmith, R., Vuong, A., Varner, J. A., Hammer, A. E., and Barrett, P. S. (2003). Lamotrigine as adjunctive therapy in patients with refractory epilepsy and mental retardation. *Epilepsy Behavior* **4**:386-394.
- McManus, M. T., and Sharp, P. A. (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature reviews. Genetics* **3**:737-747.
- Miller, J. F. (1995). Individual differences in vocabulary acquisition in children with Down syndrome. In L. Nadel and D. Rosenthal (eds.). Baltimore: Paul H Brookes Pub
- Miller, V. M., Gouvion, C. M., Davidson, B. L., and Paulson, H. L. (2004). Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucleic Acids Res.* **32**:661-668.
- Miller, V. M., Xia, H., Marrs, G. L., Gouvion, C. M., Lee, G., Davidson, B. L., and Paulson, H. L. (2003). Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **100**:7195-7200.
- Muller, N., Riedel, M., Schwarz, M. J., and Engel, R. R. (2005). Clinical effects of COX-2 inhibitors on cognition in schizophrenia. *Eur. Arch. Psychiat. Clin. Neurosci.* **255**:149-151.
- Mufson, E. J., Cochran, E., Benzing, W., and Kordower, J. H. (1993). Galaninergic innervation of the cholinergic vertical limb of the diagonal band (Ch2) and bed nucleus of the stria terminalis in aging, Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Dementia* **4**:237-250.
- Nadel, L. (2003). Down's syndrome: a genetic disorder in biobehavioral perspective. *Genes, Brain, Behavior* **2**:156-166.
- Napolitano, G., Palka, G., Lio, S., Bucci, I., De Remigis, P., Stuppia, L., and Monaco, F. (1990). Is zinc deficiency a cause of subclinical hypothyroidism in Down syndrome? *Annales de genétique* **33**:9-15.
- Netto, C. B., Siquiera, I. A., Fochesatto, C., Portela, L. V., Tavares, M. P., Souza, D. O., Giugliani, R., and Goncalves, C. A. (2004). S100B content and SOD activity in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Clinical Biochem.* **37**:134-137.
- Okada, T., Nomoto, T., Shimazaki, K., Lijun, W., Lu, Y., Matsushita, T., Mizukami, H., Urabe, M., Hanazono, Y., Kume, A., Muramatsu, S., Nakano, I., and Ozawa, K. (2002). Adeno-associated virus vectors for gene transfer to the brain. *Methods* **28**:237-247.
- Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., and Conklin, D. S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Develop.* **16**:948-958.
- Patel, B. N., Seltzer, G. B., Wu, H. S., and Schupf, N. (2001). Effect of menopause on cognitive performance in women with Down syndrome. *Neuroreport* **12**:2659-2662.
- Pennington, B. F., Moon, J., Edgin, J., Stedron, J., and Nadel, L. (2003). The neuropsychology of Down syndrome: evidence for hippocampal dysfunction. *Child Develop.* **74**:75-93.
- Perry, E. K., Perry, R. H., Blessed, G., and Tomlinson, B. E. (1978). Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **4**:273-277.
- Pruess, J. B., Fewell, R. R., and Bennett, F. C. (1989). Vitamin therapy and children with Down syndrome: a review of the research. *Exceptional Children* **55**:336-341.
- Romano, C., Tine, A., Fazio, G., Rizzo, R., Colognola, R. M., and Sorge, G. (1990). Seizures in patients with trisomy 21. *Am. J. Med. Genet. Suppl.* **7**:298-300.
- Ralph, G. S., Radcliffe, P. A., Day, D. M., Carthy, J. M., Leroux, M. A., Lee, D. C., Wong, L. F., Bilsland, L. G., Greensmith, L., Kingsman, S. M., Mitrophanous, K. A., Mazarakis, N. D., and Azzouz, M. (2005). Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat. Med.* **11**:429-433.
- Raoul, C., Abbas-Terki, T., Bensaoud, J. C., Guillot, S., Haase, G., Szule, J., Henderson, C. E., and Aebischer, P. (2005). Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat. Med.* **11**:423-428.
- Roizen, N. J., and Patterson, D. (2003). Down's syndrome. *Lancet* **361**:1281-1289.
- Salman, M. S. (2002). Systematic review of the effect of therapeutic dietary supplements and drugs on cognitive function in subjects with Down syndrome. *Eur. J. Paediat. Neurol.: EJP* **6**:213-219.
- Shishkina, G. T., Kalinina, T. S., and Dygalo, N. N. (2004). Attenuation of alpha2A-adrenergic receptor expression in neonatal rat brain by RNA interference or antisense oligonucleotide reduced anxiety in adulthood. *Neuroscience* **129**:521-528.
- Schubert, P., Ogata, T., Marchini, C., and Ferroni, S. (2001). Gliar-related pathomechanisms in Alzheimer's disease: a therapeutic target? *Mech. Ageing Develop.* **123**:47-57.
- Scheuer, K., Maras, A., Gattaz, W. F., Cairns, N., Forst, H., and Muller, W. C. (1996). Cortical NMDA receptor properties and membrane fluidity are altered in Alzheimer's disease. *Dementia* **7**:210-214.
- Schupf, N., Zigman, W., Kapell, D., Lee, J. H., Kline, J., and Levin, B. (1997). Early menopause in women with Down's syndrome. *J. Intellect. Disability Res.: JIDR* **41**:264-267.

- Sebastià, J., Cristófol, R., Pertusa, M., Vilchez, D., Torà, N., Barambio, S., Rodríguez-Farré, E., and Sanfeliu, C. (2004). Down's syndrome astrocytes have greater antioxidant capacity than euploid astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* **20**:2355–2366.
- Seidl, R., Kaehler, S. T., Prast, H., Singewald, N., Cairns, N., Gratzner, M., and Lubec, G. (1999). Serotonin (5-HT) in brains of adult patients with Down syndrome. *J. Neural Transmission. Supplementum* **57**:221–232.
- Siarey, R. J., Coan, E. J., Rapoport, S. I., and Galdzicki, Z. (1997). Responses to NMDA in cultured hippocampal neurons from trisomy 16 embryonic mice. *Neurosci. Lett.* **232**:131–134.
- Sinet, P. M. (1982). Metabolism of oxygen derivatives in Down's syndrome. *Annals N.Y. Acad. Sci.* **185**:83–94.
- Singh, B. K., and White-Scott, S. (2002). Role of topiramate in adults with intractable epilepsy, mental retardation, and developmental disabilities. *Seizure* **11**:47–50.
- Sodhi, M. S., and Sanders-Bush, E. (2004). Serotonin and brain development. *Int. Rev. Neurobiol.* **59**:111–174.
- Spiker, D., and Hopmann, M. R. (1997). The effectiveness of early intervention for children with Down syndrome. In M. J. Guralnick (ed.) *The Effectiveness of Early Intervention*. Baltimore: Paul H. Brookes, pp. 271–305.
- Stafstrom, C. E. (1993). Epilepsy in Down syndrome: clinical aspects and possible mechanisms. *Am. J. Mental Retard.: AJMR* **98**:12–26.
- Stafstrom, C. E., Gilmore, H. E., and Ehrenberg, B. L. (1988). Seizures in persons with Down syndrome: cause and prognosis. *Annals Neurol.* **24**:308–309.
- Takashima, S., Becker, L. E., Armstrong, D. L., and 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. *J. Neuro pathol. Exp. Neurol* **39**:487–501.
- Takashima, S., Iida, K., Mito, T., and Arima, M. (1994). Dendritic and histochemical development and ageing in patients with Down's syndrome. *J. Intellect. Disability Res.: JIDR* **38**:265–273.
- Thakker, D. R., Natt, F., Husken, D., Maier, R., Muller, M., van der Putten, H., Hoyer, D., and Cryan, J. F. (2004). Neurochemical and behavioral consequences of widespread gene knockdown in the adult mouse brain by using nonviral RNA interference. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **101**:17270–17275.
- Thiel, R., and Fowkes, S. W. (2005). Can cognitive deterioration associated with Down syndrome be reduced? *Medical hypotheses* **64**:524–532.
- Torchilin, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews. Drug Discovery* **4**:145–160.
- Turrens, J. F. (2001). Increased superoxide dismutase and Down's syndrome. *Medical Hypotheses* **56**:617–619.
- Van Trotsenburg, A. S. P., Vulsma, T., van Rozenburg-Marres, S. L. R., van Baar, A. L., Ridder, J. C. D., Heymans, H. S. A., Tijssen, J. G. P., and de Vijlde, J. J. M. (2005). The effect of thyroxine treatment started in the neonatal period on development and growth of two years old Down syndrome children: a randomized clinical trial. *The J. Clin. Endocrinol. Metabol.* Epub
- Vernon, M. W., and Sorokin, E. M. (1991). Piracetam. An overview of its pharmacological properties and a review of its therapeutic use in senile cognitive disorders. *Drugs Aging* **1**:17–35.
- Vuksic, M., Petanjek, Z., Rasin, M., and Kostovic, I. (2002). Perinatal growth of prefrontal layer III pyramids in Down syndrome. *Pediatric Neurol.* **27**:36–38.
- Wishart, J. G. (1995). Cognitive abilities in children with Down syndrome: developmental instability and motivational deficits. *Progr. Clin. Biol. Res.* **393**:57–91.
- Wisniewski, K. E., Wisniewski, H. M., and Wen, G. Y. (1985). Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Annals Neurol.* **17**:278–282.
- Wright, C. I., Geula, C., and Mesulam, M. M. (1993). Neuroglial cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles and patterns of selective vulnerability. *Annals Neurol.* **34**:373–384.
- Xia, H., Mao, Q., Eliason, S. L., Harper, S. Q., Martins, I. H., Orr, H. T., Paulson, H. L., Yang, L., Kotin, R. M., and Davidson, B. L. (2004). RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat. Med.* **10**:816–820.
- Xia, H., Mao, Q., Paulson, H. L., and Davidson, B. L. (2002). siRNA-mediated gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* **20**:1006–1010.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**:25–33.
- Zhang, Y., Boado, R. J., and Pardridge, W. M. (2003a). *In vivo* knockdown of gene expression in brain cancer with intravenous RNAi in adult rats. *The J. Gene Med.* **5**:1039–1045.
- Zhang, Y. F., Boado, R. J., and Pardridge, W. M. (2003b). Absence of toxicity of chronic weekly intravenous gene therapy with pegylated immunoliposomes. *Pharmaceutical Res.* **20**:1779–1785.
- Zigman, W. B., Schupf, N., and Sersen, E. (1995). Prevalence of dementia in adults with and without Down syndrome. *Am. J. Mental Retard.: AJMR* **100**:403–412.