

**Estudio de los efectos de la reducción de la expresión de
Dyrk1A, mediante interferencia de RNA, sobre el fenotipo
motor del modelo transgénico TgDyrk1A. Implicación de los
receptores glutamatérgicos de tipo NMDA**

Jon Ortiz Abalia

Tesis doctoral



Estudio de los efectos de la reducción de la expresión de Dyrk1A, mediante interferencia de RNA, sobre el fenotipo motor del modelo transgénico TgDyrk1A. Implicación de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA

Jon Ortiz Abalia

Memoria presentada para optar al grado de doctor
por la Universitat Pompeu Fabra

Esta tesis doctoral ha sido realizada bajo la dirección
de la Dra. Cristina Fillat Fonts en el programa de Gens i Malaltia
del Centre de Regulació Genòmica.

Tesis doctoral adscrita al Departament de Ciències Experimentals i de la Salut,
Universitat Pompeu Fabra.

International PhD Program in Health and Life Sciences,
Bienio 2003-2005

Cristina Fillat Fonts

Jon Ortiz Abalia

Barcelona, marzo 2008

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- AAV:** virus adenoasociado (*Adeno-associated Virus*)
- AD:** enfermedad de alzheimer (*Alzheimer Disease*)
- AMPA:** ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
- APP:** proteína precursora amiloide (*Amyloid Precursor Protein*)
- AraC:** arabinósido C
- ATP:** adenosina trifosfato
- BAC:** cromosoma artificial de bacteria (*Bacterial Artificial Chromosome*)
- BACE:** *Beta-site APP-Cleaving Enzyme*
- BCA:** ácido bicinconínico
- BSA:** suero de albúmina bovina
- cat.no.:** categoría número
- cDNA:** ADN complementario
- CGN:** neuronas granulares de cerebelo (*Cerebellar Granular Neurons*)
- CMV:** citomegalovirus
- CREB:** elemento de respuesta al AMP cíclico (*Cyclic AMP Response Element-Binding protein*)
- c.s.p.:** cantidad suficiente para
- DAB:** diaminobenzidina
- DAPI:** 4,6-diamidino-2-fenolindol
- DIV:** día *in vitro*
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- DNA:** ácido desoxiribonucleico
- D.O.:** densidad óptica
- DSCR:** región crítica del síndrome de Down (*Down Syndrome Critical Region*)
- DYRK1A:** *Dual-specificity Yak1p yeast Related Kinase*
- EDTA:** ácido etilendiaminotetracético
- ELA (ALS):** esclerosis lateral amiotrófica (*Amyotrophic Lateral Sclerosis*)
- ELISA:** *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
- FA:** fosfatasa alcalina
- FBS:** suero bovino fetal
- Fig.:** figura
- GFP:** proteína verde fluorescente
- dH₂O:** agua destilada
- HSA21:** cromosoma 21 humano (*Homo Sapiens Autosome 21*)
- IR:** infrarrojo (*infrared*)
- KA:** ácido kaínico (*Kainate Acid*)
- kb:** kilobase
- kDA:** kiloDalton

LB (medio): medio de cultivo Luria-Bertani

LTD: *Long Term Depression*

LTP: *Long Term Potentiation*

MMU10, MMU16, MMU17: cromosomas 10, 16 y 17 murinos (*Mus musculus* 10, 16, 17)

MOI: *Multiplicity of infection*

MTT: [3(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazol bromuro)]

Nd: no disponible

NFAT: *Nuclear Factor of Activated T-cells*

NLS: señal de localización nuclear (*Nuclear Localization Signal*)

NMDA: N-Metil D-Aspartato

O/N: overnight

pb: pares de bases

PBS: solución tamponadora de fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PD7 (P7), PD14 (P14): día postnatal 7, día postnatal 14

PEG: polietilenglicol

PFA: paraformaldehído

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PPI: inhibición mediada por prepulso (*Prepulse Inhibition*)

PSA: persulfato amónico

RNA: ácido ribonucleico

SCA-1: ataxia espinocerebelar de tipo 1 (*Spinocerebellar Ataxia type 1*)

SD: síndrome de Down

SDS: dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

SNC: sistema nervioso central

SOD: superóxido dismutasa

T^a amb.: temperatura ambiente

TBE: Tris-Borato EDTA

TBS: Tris-Borato Sodio

TE: Tris-EDTA

TEMED: tetrametil etilendiamina

Tg: ratón transgénico

TM: Treadmill

Ts: ratón trisómico

vp: partículas virales

YAC: cromosoma artificial de levadura (*Yeast Artificial Chromosome*)

Unidades de medida

cm, cm², cm³ : centímetro, centímetro cuadrado, centímetro cúbico

db: decibelio

diam.: diámetro

g, mg, μ g, ng: gramo, miligramo, microgramo, nanogramo

h: hora

l, ml, μ l, nl: litro, mililitro, microlitro, nanolitro

λ : longitud de onda

LU: unidad de luz (*Light Unit*)

M, mM, μ M: molar, milimolar, micromolar

m, m², m³: metro, metro cuadrado, metro cúbico

mm, mm², mm³: milímetro, milímetro cuadrado, milímetro cúbico

min: minuto

nm: nanómetro

p/p: peso/peso

p/v: peso/volumen

r.p.m.: revoluciones por minuto

s: segundos

V: volumen

Vf: volumen final

INDICE

INDICE

ABREVIATURAS	I
INDICE	VII
INTRODUCCION	1
1. El síndrome de Down (SD)	1
1.1. Historia del SD	1
1.2. Aspectos generales del SD	1
1.3. Aspectos clínicos del SD	2
1.4. Origen de la Trisomía 21	4
1.5. Correlación genotipo-fenotipo.	5
1.5.1. Hipótesis de la dosis génica	5
1.5.2. Búsqueda de genes candidatos	6
1.6. Tratamiento para el SD	8
2. Modelos murinos de SD	11
2.1. Modelos trisómicos (MMU16)	11
2.1.1. Modelo Ts16	12
2.1.2. Modelo Ts65Dn	13
2.1.3. Modelo TsCje	14
2.1.4. Modelo Ms1Cje/Ts65Dn	14
2.1.5. Modelo Ts1Rhr	15
2.1.6. Modelo Tc1	15
2.2. Modelos transgénicos de YACs, BACs y PACs	15
2.3. Modelos transgénicos de genes únicos	15
2.3.1. Modelo TgDyrk1A	15
3. El gen DYRK1A	18
3.1. Familia de proteínas DYRK1A	18
3.2. Patrón de expresión de DYRK1A	19
3.3. Estructura proteica de DYRK1A	19
3.4. Localización subcelular de DYRK1A	20
3.5. Función de DYRK1A	20
4. Receptores NMDA de glutamato	24
4.1. Definición y clasificación	24
4.2. Composición del receptor NMDA	25
4.3. Expresión del receptor NMDA en el SNC	27
4.4. Papel del receptor NMDA en condiciones fisiológicas	27
4.5. Papel del receptor NMDA en condiciones patológicas	29
5. Terapia génica para enfermedades del SNC	32

5.1. Virus adenoasociados (AAs)	33
5.1.1. Generalidades de los AAVs	
5.1.2. rAAV como vector de terapia génica para el SNC	35
5.2. RNA de interferencia (RNAi)	39
5.2.1. Historia del RNAi	39
5.2.2. Mecanismo del RNAi	41
5.2.3. RNAi como herramienta de silenciamiento	41
5.2.4. Uso del RNAi como herramienta de terapia génica para el SNC	42
OBJETIVOS	47
MATERIALES Y METODOS	51
1. Técnicas de manipulación de bacterias	51
1.1. Preparación de células competentes.	51
1.2. Transformación de bacterias competentes.	51
2. Técnicas de obtención y manipulación del DNA	53
2.1. Minipreparación de DNA plasmídico.	53
2.2. Maxipreparación de DNA plasmídico.	53
2.3. Cuantificación del DNA (D.O.).	54
2.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	54
2.5. Construcción de plásmidos.	55
2.5.1. Obtención de insertos de DNA mediante la digestión con enzimas de restricción y posterior purificación de los fragmentos de DNA resultantes.	55
2.5.2. Obtención de insertos de DNA mediante anillamiento de oligonucleótidos.	56
2.5.3. Preparación del vector para la ligación.	56
2.5.4. Ligación de fragmentos de DNA.	57
2.6. Secuenciación de fragmentos de DNA.	58
2.6.1. Reacción de secuencia.	58
2.6.2. Purificación y análisis de los productos de la reacción de secuencia.	59
2.7. Extracción de DNA genómico de ratón.	60
2.8. PCR de genotipación.	60
3. Técnicas de obtención y manipulación de proteínas	62
3.1. Obtención de proteína de extractos totales.	62
3.1.1. Obtención de extractos proteicos a partir de células de mamífero.	62
3.1.2. Obtención de extractos proteicos a partir de tejido de ratón.	62
3.2. Cuantificación de proteínas.	63
3.3. Determinación de la actividad luciferasa.	64
3.4. Análisis de proteínas mediante Western Blot.	64
3.4.1. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).	65
3.4.2. Electrotransferencia.	66
3.4.3. Inmunodetección.	66
3.5. Inmunofluorescencias sobre células.	68
3.6. Inmunohistoquímica sobre secciones de tejido de ratón.	69
3.6.1. Preparación del tejido y obtención de las secciones de cerebro.	69
3.6.2. Tinciones histológicas.	71
3.6.3. Inmunohistoquímica sobre secciones de cerebro en flotación.	72
3.6.4. Inmunohistoquímica sobre secciones de parafina.	73

4. Cultivos celulares y técnicas relacionadas	76
4.1. Cultivos primarios de células granulares de cerebelo.	76
4.1.1. Disección y establecimiento de cultivos primarios de células granulares del cerebelo.	77
4.1.2. Siembra y condiciones de cultivo.	78
4.2. Transfecciones.	79
4.3. Transducción de células con vectores virales adenoasociados (AAV).	80
4.3.1. Transducción de células HEK293.	81
4.3.2. Transducción de cultivos primarios neuronales.	81
4.4. Tratamientos celulares.	82
4.5. Ensayo de medición de la actividad metabólica: MTT.	82
5. Métodos relacionados con la manipulación de animales	84
5.1. Modelo TgDyrk1A.	84
5.2. Pruebas conductuales.	84
5.2.1. Actimetría.	85
5.2.2. Cinta giratoria sinfin (<i>Treadmill test</i>).	85
5.2.3. Reflejo del sobresalto (<i>Startle Reflex Test</i>).	86
5.3. Procedimiento de estereotaxia e inyección viral.	87
5.4. Técnicas de imagen in vivo: bioluminiscencia.	90
5. Análisis estadístico	92
6. Listado de plásmidos y virus utilizados	93
RESULTADOS	97
1. Caracterización y análisis funcional de la expresión de las subunidades del receptor NMDA de glutamato en el modelo TgDyrk1A en cerebelo y núcleo estriado.	97
1.1. Estudio de la expresión de las subunidades del receptor NMDA en el cerebelo adulto.	97
1.2. Estudio de la expresión de las subunidades del receptor NMDA en el cerebelo a estadios tempranos postnatales (P7 y P14).	99
1.2.1. Estudio de la expresión de las subunidades del receptor NMDA a P14.	100
1.2.2. Estudio de la expresión de las subunidades del receptor NMDA a P7.	101
1.3. Estudio de la expresión de las subunidades del receptor NMDA en cultivos primarios de células granulares (CGN, <i>Cerebellar Granular Neurons</i>).	102
1.4. Análisis funcional de los canales de NMDA.	103
1.4.1. Estudio de la sensibilidad a estímulos excitotóxicos en CGNs.	104
1.5. Estudio de la expresión de las subunidades del receptor NMDA en el núcleo estriado adulto.	115
2. Caracterización del fenotipo motor en el ratón TgDyrk1A.	109
2.1. Hiperactividad. Test de actimetría.	109
2.2. Alteraciones en coordinación motora. Test de la cinta giratoria sinfin.	110
2.3. Alteraciones en la integración sensorimotora. Test del reflejo del sobresalto.	111
3. Desarrollo de una estrategia de terapia génica para corregir las	113

alteraciones motoras causadas por la sobreexpresión de Dyrk1A en el núcleo estriado mediante RNA de interferencia.

3.1. Construcción del plásmido inhibidor shDyrk1A	113
3.1.1. Identificación de la secuencia diana y diseño de los oligos	113
3.1.2. Clonaje en el plásmido pBSU6	114
3.2. Validación de shDyrk1A como inhibidor del gen DYRK1A	115
3.2.1. Inhibición de la expresión ectópica de DYRK1A	116
3.2.2. Inhibición de la expresión de DYRK1A endógeno	117
3.3. Validación de AAV-shDyrk1A como inhibidor del gen DYRK1A <i>in vitro</i>	118
3.3.1. Generación de dos vectores virales adenoasociados: AAV-shDyrk1A y AAV-scDyrk1A	118
3.3.2. Evaluación de la eficiencia de transducción viral <i>in vitro</i> .	119
3.3.3. Evaluación de la expresión de Dyrk1A tras infección con AAV-shDyrk1A y AAV-scDyrk1A <i>in vitro</i> .	120
3.4. Validación de AAV-shDyrk1A como inhibidor del gen DYRK1A <i>in vivo</i>	120
3.4.1. Evaluación de la especificidad de la transducción viral <i>in vivo</i> tras inyección intraestriatal de AAVs mediante procedimiento de estereotaxia	121
3.4.2. Monitorización de la expresión de luciferasa tras inyección intraestriatal con AAVs	124
3.4.3. Estudio del curso temporal de la inhibición de Dyrk1A tras administración intraestriatal de AAV-shDyrk1A	125
3.5. Estudio de los efectos en el fenotipo motor del modelo murino TgDyrk1A tras administración intraestriatal de AAV-shDyrk1A y su repercusión sobre la expresión de las subunidades del receptor NMDA. Validación de Dyrk1A como diana terapéutica.	127
3.5.1. Estudio de las consecuencias en las alteraciones motoras presentes en el modelo TgDyrk1A tras administración viral de AAV-shDyrk1A en el núcleo estriado.	127
3.5.1.1. Hiperactividad. Test de actimetría.	128
3.5.1.2. Alteraciones en coordinación motora. Test de la cinta giratoria sinfin.	129
3.5.1.3. Alteraciones en la integración sensorimotora. Test del reflejo del sobresalto.	132
3.5.2. Estudio de la expresión de las subunidades del receptor NMDA de glutamato tras administración intraestriatal de AAV-shDyrk1A	135
DISCUSION	139
CONCLUSIONES	153
BIBLIOGRAFIA	157
ANEXO	183

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCION

1. El síndrome de Down (SD)

1.1. Historia

A lo largo de la historia, muchos han sido los datos que evidenciaban la existencia de personas afectadas con SD, desde restos arqueológicos u obras de arte hasta los primeros informes documentados (el primero atribuido a Etienne Esquirol en 1838) en los que se empezó a utilizar los términos de “cretinismo”, “mongolismo” o “idiotia furfurácea”. No fue hasta 1886 cuando el médico inglés John Langdon Down describió detalladamente las características físicas de un grupo de pacientes que presentaban muchas similitudes, hablando por primera vez de una patología de tipo sindrómica. En 1909, se mencionó por primera vez en una comunicación científica la edad materna como factor de riesgo en el SD (G. E. Shuttleworth, 1909). En 1932 se hizo referencia a un reparto anormal de material cromosómico como posible causa del SD. En 1956 Tjio y Levan demostraron la existencia de 46 cromosomas en el ser humano y poco después, en el año 1959, de forma paralela, el equipo formado por Lejeune, Gautrier y Turpin (Lejeune et al., 1959) en Francia y el equipo de P. Jacobs en el Reino Unido (Jacobs et al., 1959) descubrieron que las personas con SD portan 1 cromosoma 21 extra, 47 cromosomas en total, definiendo así la causa genética de la patología. En 1961, la OMS (Organización Mundial de la Salud) hizo efectivo el cambio de nomenclatura y la condición de “mongolismo” pasó a denominarse oficialmente Síndrome de Down.

1.2. Aspectos generales

El SD o Trisomía 21 es la aneuploidía autosómica más frecuente y la principal causa genética de retraso mental (representa el 25% de todos los casos) y de defectos cardíacos congénitos. Presenta una incidencia variable de 1/700 a 1/1200 recién nacidos vivos. Si bien el retraso mental, la hipotonía muscular, el retardo en el crecimiento, las dismorfologías físicas y las alteraciones neuropatológicas asociadas con la enfermedad de Alzheimer (individuos > 35 años) son unas características constantes en los individuos con SD, han sido descritos más de 100 rasgos fenotípicos distintivos del SD apareciendo con una penetrancia variable y una expresividad diferencial (Tabla 1). El SD cursa a menudo con alteraciones endocrinas, musculares,

gastrointestinales, odontoestomatológicas, cardiopáticas, oculares, auditivas e inmunológicas (Epstein, 2002). Hoy en día la esperanza de vida de los individuos con SD ha aumentado considerablemente en los últimos 30 años, pasando de los 26 a los 60 años. Entre los factores que pueden haber contribuido a esta mejora se incluyen: la mejora en los tratamientos para algunas de las causas de mortalidad más frecuentes y los cambios en la práctica médica, incluyendo la cirugía cardíaca para niños con síndrome de Down, en circunstancias que no habrían sido atendidas en el pasado. Como contrapunto, hay que añadir que la gran disparidad social hace que determinadas etnias o poblaciones queden privadas de dichos avances médicos y por lo tanto, no vean aumentada la esperanza de vida en los individuos con SD de la misma manera que las sociedades occidentales.

1.3. Aspectos clínicos del SD

FENOTIPO	FRECUENCIA EN DS (%)
Retraso mental	100%
Neuropatología de tipo Alzheimer	100% (ind. > 35 años)
Hipotonía muscular	100%
Infertilidad masculina	100%
Dermatoglifos característicos	85%
Corta estatura	70%
Braquicefalia	75%
Pliegues epicánticos	60%
Manchas de Brushfield en iris	55%
Protrusión lingual	45%
Pavellones auditivos dismórficos	50%
Manos cortas y amplias	65%
5º dedo de la mano corto	60%
Cardiopatía congénita	40%
Canal atrioventricular	16%
Atresia/Estenosis dudodenal	Riesgo x 250
Ano imperforado	Riesgo x 50
Enfermedad de Hirschprung	Riesgo x 30
Leucemia megacariocítica aguda (LMA)	Riesgo x 200-400
Leucemia (linfoblástica aguda (LLA) + LMA)	Riesgo x 10-20

Tabla 1: Frecuencia fenotípica en los individuos con SD (%). Modificada a partir de (Antonarakis et al., 2004)

- ***Retraso mental y alteraciones neurológicas***

Todos los individuos con SD presentan severos fenotipos neurológicos y conductuales, disfunción cognitiva y un bajo coeficiente intelectual (CI entre 30 y 70) (ver Tabla 2). La infancia

se caracteriza por un retardo en el desarrollo cognitivo que conduce a un retraso mental moderado y a un descenso del CI desde el primer año de vida hasta la infancia tardía. En los individuos adultos se produce un deterioro cognitivo debido presumiblemente a un envejecimiento acelerado. A esto, hay que añadir además, la aparición precoz de síntomas neuropatológicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer en la cuarta década de vida aunque hay estudios que describen el depósito de proteína amiloide ya en la segunda década (Rumble et al., 1989).

Morfológicamente, se ha visto que a nivel macroscópico el cerebro de los individuos con SD presentan un tamaño y peso reducidos (Jernigan and Bellugi, 1990), un cierto grado de hipoplasia tanto en el cerebelo (Aylward et al., 1997) como en los lóbulos frontal y parietal (Pinter et al., 2001a) así como también en el hipocampo (Pinter et al., 2001b). A nivel microscópico, hay estudios que demuestran una reducción relativa en el número de neuronas, así como alteraciones en el patrón de laminación a nivel de la corteza cerebral, del hipocampo y del cerebelo (Wisniewski, 1990). Además, estudios funcionales han demostrado que los procesos de aprendizaje dependientes de hipocampo se ven particularmente afectados y también existen evidencias de alteraciones funcionales a nivel de corteza prefrontal y cerebelo (Nadel, 2003). El descubrimiento de alteraciones en los mecanismos de LTP (*Long Term Potentiation*) y LTD (*Long Term Depression*) subyacentes a los procesos de memoria y aprendizaje (Kleschevnikov et al., 2004), y de alteraciones morfológicas en las espinas dendríticas (Ferrer and Gullotta, 1990; Weitzdoerfer et al., 2001) en individuos con SD podrían ayudar a entender mejor las causas de los déficits cognitivos y la búsqueda de potenciales dianas terapéuticas para dichas disfunciones.

Fenotipos de tipo neurológico y conductual	Referencias
Desarrollo más temprano de las alteraciones neuropatológicas asociadas con la enfermedad de Alzheimer	(Dalton and Crapper-McLachlan, 1986)
Menor número y densidad neuronal; diferenciación neuronal y sinaptogénesis anormales; retraso en la mielinización	(Coyle et al., 1986), (Becker et al., 1986; Becker, 1991), (Wisniewski and Schmidt-Sidor, 1989), (Wisniewski, 1990), (Vuksic et al., 2002)
Alteración en morfología, número y densidad de las dendritas, las sinapsis y espinas dendríticas	(Marin-Padilla, 1972, 1976), (Purpura, 1974), (Becker et al., 1986; Becker, 1991), (Takashima et al., 1989; Takashima et al., 1994) (Golden and Hyman, 1994)
Alteración en la formación de capas corticales.	(Weis et al., 1991), (Wang et al., 1992), (Raz et al., 1995), (Teipel et al., 2003)
Hipoplasia del hipocampo y córtex; mayor giro parahipocámpico	(Jernigan et al., 1993), (Raz et al., 1995), (Aylward et al., 1997)
Reducción en el tamaño cerebelar y volumen de los	(Yates et al., 1983), (Casanova et al., 1985)

lóbulos VI-VIII	(Wisniewski and Bobinski, 1991), (Risser et al., 1997), (Schneider et al., 1997) (Nadel, 2003)
Degeneración de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal	
Alteraciones en los neurotransmisores	(Chapman et al., 1998)
Alteraciones funcionales en córtex prefrontal y cerebelo	(Brown et al., 1990), (Fidler and Hodapp, 1999), (Nadel, 2003)
Deficiencia en producción del lenguaje, en el habla y articulación	(Carlesimo et al., 1997), (Fidler and Hodapp, 1999), (Brown et al., 2003), (Clark and Wilson, 2003)
Bajo coeficiente intelectual (CI) y déficits cognitivos	
Déficits en memoria a corto y largo plazo	

Tabla 2. Fenotipos de tipo neurológico y conductual en individuos con SD. Adaptado de Rachidi & Lopes (2007)

1.4. Origen de la Trisomía 21

La trisomía puede ser de varios tipos dependiendo del origen citogenético (ver Tabla 3): 1) trisomía completa o simple (95% de los casos), que consiste en tener una copia extra del cromosoma 21 entero. La causa más frecuente que da lugar a este tipo de trisomía es una no-disyunción meiótica que puede ser de origen materno (en un 93% de los casos) o paterno; pero también puede darse la no disyunción en las primeras divisiones embrionarias y dar lugar a un mosaicismo (1.5% de los casos) en el que un porcentaje variable de células del individuo será aneuploide y el resto euploide. 2) trisomía parcial debido a translocaciones (3.5% de los casos). Estas pueden ser robertsonianas, que ocurre cuando se produce una fusión de los brazos largos o bien de los brazos cortos a nivel del centrómero entre dos cromosomas acrocéntricos, o recíprocas cuando se produce un intercambio de material cromosómico entre HSA21 y cualquier otro cromosoma.

Así, se conoce que el origen de la trisomía del cromosoma 21 se debe principalmente a una no-disyunción en la meiosis I (77%; frente a un 23% en la meiosis II) durante la ovogénesis. En este punto se ha demostrado una relación clara entre la edad materna y el proceso de no-disyunción meiótica, aunque las causas son desconocidas por el momento. El riesgo de tener un hijo con SD incrementa de forma lineal hasta los 38 años de edad de la madre y a partir de esta edad, el riesgo aumenta de manera exponencial (Hook, 1983).

Origen citogenético de la Trisomía 21	Frecuencia (%)
Trisomía completa o simple	
47, +21	90-93%
47, +21/46 (mosaicismo)	1-3.5%
Translocaciones Robertsonianas	3-4%
46,-14, +Rob (14,21)	1.5-3.5%
46,-21, +Rob (21,21)	1.5-3%
46,-15, +Rob (15,21)	0.4%
46,-13, +Rob (13,21)	0.3%
46,-22, +Rob (22,21)	0.2%
Translocaciones no robertsonianas	0.2-0.3%

Tabla 3: Frecuencias de las diversas alteraciones cromosómicas y translocaciones que originan la Trisomía 21

1.5. Correlación genotipo-fenotipo.

Actualmente, dos hipótesis tratan de explicar los efectos causados por la presencia de un cromosoma 21 extra en los distintos fenotipos del SD. La primera de ellas, “la hipótesis de la dosis génica”, cada vez más respaldada, es considerada por muchos como la hipótesis central y consiste en explicar el fenotipo de SD como el efecto causado por la sobreexpresión de determinados genes presentes en el cromosoma 21 (más adelante se habla con más detalle sobre esta hipótesis). La segunda, la de la “amplificación de la inestabilidad del desarrollo” aboga más bien por un efecto inespecífico mediado por un desequilibrio cromosómico en la homeostasis genética (Shapiro, 1999).

1.5.1. Hipótesis de la dosis génica

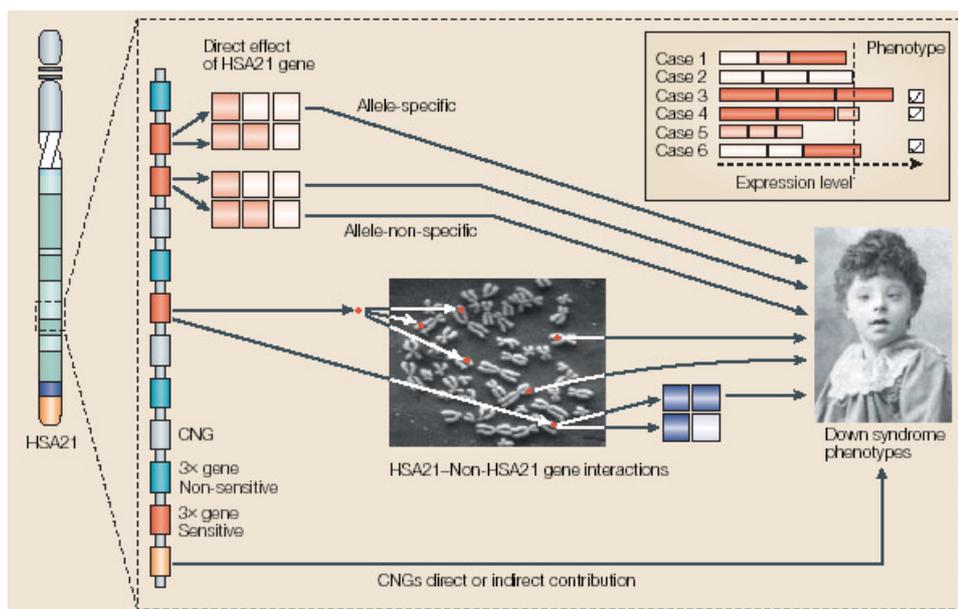
Tomando como cierta la hipótesis de la dosis génica, el fenotipo SD vendría causado por un exceso de dosis tanto de genes como de secuencias no codificantes (microRNAs, secuencias reguladoras etc...) contenidos en el HSA21, efecto que vendría modulado por la composición alélica de los genes triplicados. A estos dos mecanismos habría que añadir los efectos epistáticos causados sobre otros productos genómicos localizados en otros cromosomas, con su correspondiente efecto de composición alélica. En un estudio realizado sobre un modelo murino con trisomía parcial de MMU16, se estimó que entre un 50 y un 60% de los genes contenidos en HSA21 (Lyle et al., 2004).

1.5.2. Búsqueda de genes candidatos

Las estimaciones basadas en distintas bases de datos y publicaciones apuntan a que el cromosoma 21 contiene unos 300 genes que codifican para proteínas (Gardiner, 2004). Un análisis de la expresión temporal y espacial de todos ellos sería crítico para determinar cuales de esos genes serían especialmente relevantes en el conjunto de fenotipos del SD, para establecer una relación entre la expresión de genes específicos y su contribución a determinados fenotipos, y por último, para entender la variabilidad fenotípica entre los individuos con SD. Una herramienta útil para buscar genes candidatos ha sido analizar individuos con distintas trisomías parciales que presentaban numerosos rasgos fenotípicos característicos del síndrome. Se ha podido acotar así una región denominada como DSCR (*Down Syndrome Critical Region*) cuya sólo aparición en trisomía ya se considera suficiente para producir el fenotipo SD (Rahmani et al., 1989; Delabar et al., 1993; Korenberg et al., 1994). Sin embargo, esta asignación de la DSCR, actualmente es motivo de controversia ya que existen individuos con trisomía parcial de regiones no incluidas en dicha región que presentan algunos de los fenotipos SD (Korenberg et al., 1994; Barlow et al., 2001). Además se ha descrito que el modelo murino trisómico para la región DSCR, el Ts1Rhr, no presenta las mismas alteraciones en hipocampo que las observadas en SD o en el modelo trisómico Ts65Dn (Olson et al., 2007). Otra de las estrategias empleadas para buscar genes candidatos, enfocada principalmente al SNC, consiste en realizar estudios de expresión diferencial entre células o tejidos euploides y trisómicos, tanto provenientes de modelos murinos como el Ts65Dn o el Ts1Cje (Amano et al., 2004; Kahlem et al., 2004; Lyle et al., 2004; Dauphinot et al., 2005; Sultan et al., 2007) como de muestras humanas (Bahn et al., 2002; Mao et al., 2003; Prandini et al., 2007). Para ello, se han utilizado distintas técnicas desde RT-PCR o hibridación in situ hasta microarrays o SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) a la hora de identificar la expresión variable de los genes del HSA21 o de sus ortólogos murinos. Todos estos estudios coinciden en demostrar la sobreexpresión de alrededor 1.5 veces de la mayoría de los genes dispuestos en trisomía con respecto a los diploides, tanto del HSA21 como de sus ortólogos en MMU16. Ahora bien, en aquellos estudios en los que se ha realizado un análisis de la expresión manteniendo la individualidad de las muestras, se observa que la mayoría de los genes presenta variabilidad interindividual tanto en las muestras trisómicas como euploides, si bien al hacer el promedio, se detecta la sobreexpresión en el *pool* trisómico (Sultan et al., 2007). Estos resultados han permitido establecer distintas categorías de genes: 1) los que presentan unos niveles de sobreexpresión significativos con respecto a los euploides y poca variabilidad en su expresión. Se postula que estos genes son buenos candidatos para los rasgos comunes presentes en SD (Gardiner, 2004; Prandini et al., 2007; Sultan et al., 2007); 2) los que presentan cierto solapamiento en sus niveles de expresión con los de los genes euploides. Estos genes serían los responsables de aquellos fenotipos variables

presentes en SD; y por último, 3) aquellos genes que presentan unos niveles de expresión indistinguibles de los de los genes euploides. Estos tendrían un efecto modulador o un bajo efecto en el fenotipo SD.

Esta variabilidad de la expresión de distintos genes presente tanto en los ratones trisómicos como en los individuos con SD se vería explicada en gran medida por la composición alélica diferencial entre individuos. Se sugiere que la aparición de los distintos fenotipos presentes en SD sería consecuencia de sobrepasar un determinado umbral tanto de la expresión de genes (o secuencias no génicas) localizados en el HSA21 (o MMU16) como de los localizados en otras cromosomas que interaccionan de alguna manera con los primeros. Como resultado existirían determinadas combinaciones alélicas que sobrepasarían ese umbral y por lo tanto darían lugar a la aparición de un determinado fenotipo, y otras combinaciones que, al no sobrepasar ese umbral, tendrían un efecto silencioso sobre el mismo fenotipo (ver Esquema 1).



Esquema 1. Influencia de la composición alélica en la aparición de fenotipos SD. Adaptado de Antonarakis et al., 2004)

Algunos de los genes candidatos que ayudan a explicar las alteraciones del SNC presentes en SD y que se han propuesto hasta hoy son:

APP, que codifica para el precursor beta-amiloide, involucrado en la formación de las placas seniles presentes en individuos con SD y enfermedad de Alzheimer. En el modelo trisómico Ts65Dn se ha descrito recientemente que la sobreexpresión de App interviene en la degeneración de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (BFCNs) (Salehi et al., 2006).

SOD1, que codifica para una Cu-Zn dismutasa, enzima clave en el metabolismo de los radicales libres derivados del oxígeno, involucrado en procesos de estrés oxidativo. El modelo TgSOD1 presenta alteraciones características del SD como anomalías en las uniones neuromusculares, unos niveles bajos de serotonina en plasma y un aumento de la biosíntesis y liberación de prostaglandinas D₂ y E₂ (Groner et al., 1994).

ETS-2, protooncogén que codifica para un factor de transcripción, crucial en el proceso de la osteogénesis. El modelo TgEts2 presenta un conjunto de malformaciones esqueléticas similares a las presentes en individuos con SD (Sumarsono et al., 1996). Recientemente se ha implicado la sobreexpresión de Ets-2 en distintos modelos trisómicos murinos como Ts65Dn o Ts1Rhr en un efecto protector sobre la aparición de ciertos tumores intestinales (Sussan et al., 2008).

SIM2, codifica para un factor de transcripción, su homólogo en *Drosophila* tiene una importante función como regulador de la neurogénesis. El modelo TgSim2 presenta ciertas alteraciones en procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje (Ema et al., 1999).

DSCR1, codifica para una proteína inhibidora de la calcineurina, implicada en la vía de transducción mediada por NFATc. Más adelante se comentará el efecto sinérgico mediado por la sobreexpresión de DSCR1 y de DYRK1A en el circuito regulador de NFATc, descrito recientemente en el modelo murino trisómico Ts65Dn (Arron et al., 2006).

DYRK1A, codifica para una serin-treonin protein quinasa. Entre sus sustratos se encuentran importantes factores de transcripción. Estudios realizados tanto sobre modelos murinos transgénicos como en mutantes de pérdida de función en distintas especies sugieren un importante papel en la fisiología del SNC. Más adelante se hablará con detalle de este gen.

1.6. Tratamiento para el SD

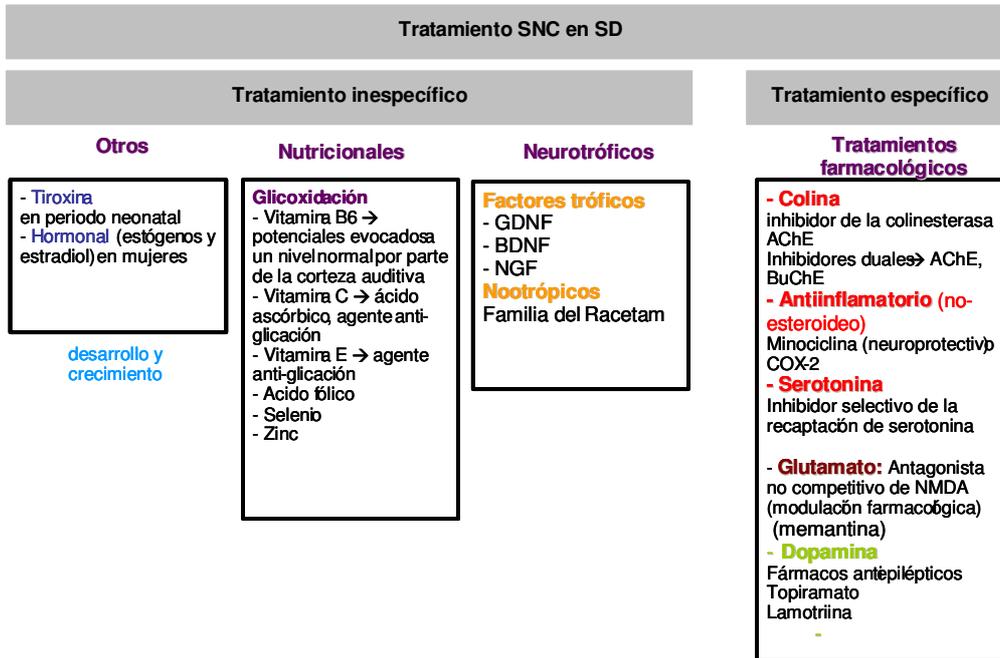
Hay que recordar que el SD, tal y como su nombre indica, es un síndrome y presenta un amplio abanico de alteraciones (ver apartado 1.3). Hoy en día, a falta de una terapia eficaz presumiblemente de carácter genético que pueda corregir el efecto mediado por aquellos genes clave en la aparición de los fenotipos más severos, se desarrollan aproximaciones terapéuticas individualizadas para cada uno de los síntomas. Mucho de estos se dan en la población general con menor incidencia, en la mayoría de los casos, por lo que se aplican los tratamientos existentes y adecuados para cada situación. Así, por ejemplo, se realizan intervenciones quirúrgicas tempranas para tratar alteraciones gastrointestinales, cardíacas y respiratorias; tratamiento hormonal para la diabetes; farmacológico para la epilepsia o quimio/radioterapéutico para la leucemia. Sin embargo, existe un gran vacío en el tratamiento de los déficits cognitivos.

Básicamente han sido dos los tipos de intervenciones que se han seguido para potenciar la función cognitiva en el SD. Uno consiste en aplicar programas de intervención temprana para ayudar a los niños con SD a desarrollar todo su potencial, y el otro consiste en el tratamiento con fármacos, vitaminas y minerales, que supuestamente incrementan el CI de los individuos con SD (ver Esquema 2). Así como los primeros han sido debidamente contrastados y actualmente presentan un valor reconocido de beneficio a corto plazo que comportan, los segundos no han mostrado una clara efectividad y están en continuo debate (ver Esquema 2).

Hoy en día, la investigación sobre el SD está basada en la premisa de que el conocimiento de los mecanismos a nivel genético y molecular ayudarán a sentar las bases para identificar los mejores genes candidatos y desarrollar las intervenciones preventivas y terapéuticas oportunas. Ejemplos de ello son los resultados obtenidos en distintos estudios realizados en el modelo murino trisómico Ts65Dn. A continuación se explican brevemente los más relevantes. Se han descrito alteraciones en la vía mitogénica mediada por la vía de sonic hedgehog (shh) como causa de la hipocelularidad cerebelar del modelo Ts65Dn, también presente en SD, y mediante el tratamiento con un agonista de la vía, SAG1.1, en ratones recién nacidos, es posible prevenir la aparición del fenotipo (Roper et al., 2006). Se ha descrito también que la excesiva inhibición gabaérgica presente en el giro dentado de los animales trisómicos podría contribuir a alterar la plasticidad sináptica. Como resultado de la administración de un antagonista gabaérgico por vía intraperitoneal, se detecta una mejoría en la realización de pruebas relacionadas con la memoria y el aprendizaje lo que sugiere la corrección de las alteraciones en LTP (*Long Term Potentiation*) presentes en el hipocampo de los animales trisómicos (Fernandez et al., 2007). El gen DSCR1 es un conocido modulador de los receptores NMDA de glutamato por lo que su sobreexpresión podría estar afectando de manera negativa la función de dichos receptores. Mediante la administración intraperitoneal de memantina, un antagonista no competitivo de los receptores NMDA, es posible corregir las alteraciones en procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje que presentan los ratones trisómico (Costa et al., 2007). Otras sustancias que han demostrado también cierto efecto terapéutico en distintas alteraciones presentes en el modelo Ts65Dn son: la fluoxetina (Clark et al., 2006), el pentilenetetrazol (Rueda et al., 2008a) y el SGS111 (Rueda et al., 2008b).

Este tipo de abordajes mecanísticos no excluye, sin embargo, que puedan darse otros enfoques terapéuticos de naturaleza no genética, basados en entender la naturaleza de las propias anomalías fenotípicas, como es el caso de las asociadas a la enfermedad de Alzheimer, presente en el fenotipo SD. En este caso, algunos estudios farmacológicos como los referentes al uso de inhibidores de colinesterasa (donepezil, galantamina o rivastigmina) han sido sustentados previamente por numerosos estudios preclínicos aunque posteriormente su eficacia clínica ha sido relativa. En

cambio, la combinación de estos con otro fármaco como es la memantina (mencionada anteriormente), ha demostrado ser de gran eficacia para el tratamiento de la disfunción cognitiva presente en el Alzheimer.



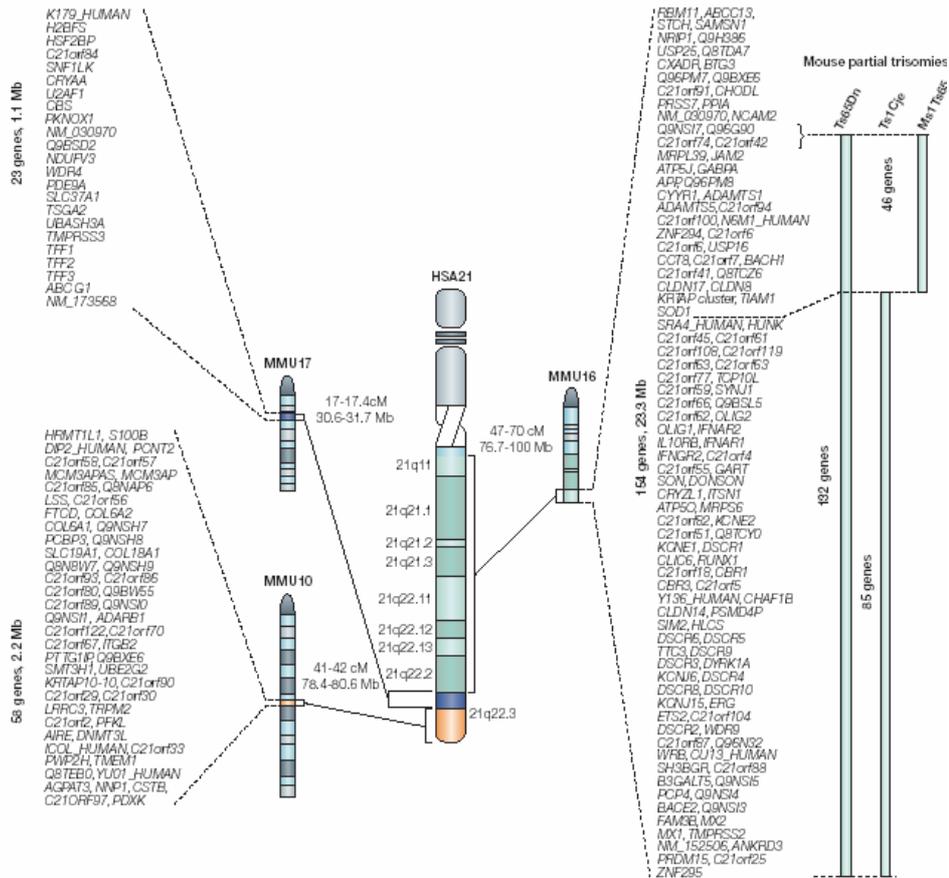
Esquema 2. Aproximaciones terapéuticas al SD. Tratamientos para las alteraciones del SNC: inespecíficos (nutricionales, neurotróficos y otros) y específicos (farmacológicos). Adaptado de (Dierssen et al., 2006)

2. Modelos murinos de SD

La idea de utilizar modelos murinos de SD surge de la necesidad de entender las causas moleculares que conducen a las distintas alteraciones presentes en el fenotipo SD. Desde que a principios de siglo XXI apareció la secuencia completa del cromosoma 21 humano (Hattori et al., 2000), numerosos grupos han dedicado sus esfuerzos a estudiar la función de los genes contenidos en el cromosoma. Los estudios en modelos celulares de sobreexpresión de muchos de esos genes contribuye en gran medida a entender su función, sin embargo estos modelos son limitados y es imprescindible el estudio de la función génica in vivo. Aún así, las limitaciones que llevaban consigo los modelos in vitro a la hora de estudiar mecanismos y procesos celulares que requirieran niveles mayores de complejidad parecidos a los dados en condiciones fisiológicas llevaron a los científicos a generar modelos in vivo. Uno de los organismos que se ha utilizado de forma extensiva en experimentación ha sido el ratón, el cual comparte un 99% de sus genes con el ser humano. Estudios de genómica comparativa pusieron de manifiesto la sintenia entre el cromosoma 21 humano (HSA21) y el 16 murino (MMU16) en un 80% (Hattori et al., 2000) mientras que el 20% restante era sinténico con los cromosomas MMU10 y MMU17 (Dierssen et al., 2001). La manipulación genética en modelos murinos va encaminada a la sobreexpresión génica en un esfuerzo por entender la contribución de un gen único, grupos de genes o segmentos genómicos que incluyen ADN no codificante (microRNAs, secuencias reguladoras etc..) a la patología provocada por la trisomía del HSA21. Hoy en día, existen 4 categorías de modelos murinos para el estudio del SD: 1) Modelos trisómicos, completos o parciales, del MMU16; 2) Modelos transcromosómicos, que contienen total o parcialmente el HSA21; 3) Modelos de sobreexpresión YAC/BAC/PAC que contienen varios de los genes del HSA21; y 4) Modelos de sobreexpresión de gen único.

2.1. Modelos trisómicos (MMU16)

En esta categoría se encuentran los modelos Ts16 (Gropp, 1975), Ts65Dn (Davisson et al., 1990), TsCje (Sago et al., 1998), Ms1Cje y Ts1Rhr (Olson et al., 2007), los cuales se describen a continuación.



Esquema 3. 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)

2.1.1. Ts16

Este modelo fue generado por una translocación robertsoniana espontánea que dio lugar a una trisomía del MMU16 (Gropp, 1975). Las principales limitaciones de este modelo son: su letalidad embrionaria (mueren hacia el día 15 de gestación), lo que impide estudiar rasgos típicos de estadios postnatales como el retraso mental o en estadios más avanzados la neuropatología asociada al Alzheimer; y la presentación en trisomía de regiones que son sinténicas con los cromosomas HSA3, HSA8 y HSA16. Sin embargo, este modelo ha proporcionado datos sobre alteraciones que se dan durante el desarrollo prenatal como malformaciones cardiacas, oculares y craneofaciales además de alteraciones en la morfogénesis cerebral (neocórtex, cerebelo, hipocampo, placa cortical) lo que recuerda a características típicas de los individuos con SD. (Dierssen et al., 2001; Seregaza et al., 2006).

2.1.2. Ts65Dn

Este modelo, considerado como el modelo de SD por antonomasia, fue generado tras una translocación no robertsoniana recíproca entre los cromosomas MMU16 y MMU17 tras ser irradiados los testículos de ratones control (Davisson et al., 1990). Estos ratones son trisómicos parciales para el MMU16 y contienen 132 genes en triple copia, aproximadamente un 60% de los genes homólogos al HSA21 (desde *Mrpl39* a *Znf295*) (Baxter et al., 2000). Como principales limitaciones se encuentran, por un lado, la presencia en trisomía de 19 genes del MMU16 no ortólogos al HSA21 que podrían interferir en la interpretación de ciertos resultados y, por otro, la variabilidad fenotípica existente en el modelo, la cual es superior a la de otros modelos trisómicos debido principalmente al uso de dos cepas consanguíneas. Sin embargo, la reproducibilidad de los fenotipos obtenidos por distintos grupos ha demostrado la validez del modelo. De entre la gran cantidad de resultados que se desprenden de los estudios realizados sobre estos ratones, cabe destacar la observación de ciertas alteraciones similares a las presentes en los individuos con SD, como son la infertilidad exclusiva de los machos, un retraso en el desarrollo, la aparición de rasgos dismórficos (Richtsmeier et al., 2000) y alteraciones del SNC, las cuales se detallan a continuación (Dierssen et al., 2001; Seregaza et al., 2006; Rachidi and Lopes, 2007):

Alteraciones a nivel de cerebelo: se ha descrito una reducción de las capas granular interna y molecular (Baxter et al., 2000; Olson et al., 2004) cuya causa parece ser una reducción del proceso mitogénico sobre los precursores neuronales (Roper et al., 2006). Además, a nivel conductual, se han detectado distintas disfunciones motoras relacionadas con la coordinación motora y el equilibrio atribuidas a alteraciones en el cerebelo (Costa et al., 1999).

Alteraciones a nivel de hipocampo: se ha observado una reducción de la densidad neuronal en el giro dentado debida a déficits en proliferación celular (Insausti et al., 1998; Rueda et al., 2005), una reducción en densidad neuronal en CA1 y sináptica en CA1 y CA3 (Kurt et al., 2004), menor densidad de espinas dendríticas en el giro dentado (Belichenko et al., 2004), hipertrofia astrocitaria (Holtzman et al., 1996), defectos a nivel sináptico relativos al sistema β -adrenérgico (Dierssen et al., 1997), reducción en LTP y aumento de LTD (Siarey et al., 1997; Siarey et al., 1999; Kleschevnikov et al., 2004) y un incremento de los niveles de β -amiloide (Hunter et al., 2004). Además, a nivel conductual, numerosos estudios han detectado alteraciones en memoria de trabajo y de referencia ((Reeves et al., 1995; Holtzman et al., 1996; Demas et al., 1998; Escorihuela et al., 1998; Sago et al., 2000).

Alteraciones a nivel del córtex: se ha descrito una reducción en la densidad sináptica (Kurt et al., 2000). El estudio neuroconductual ha revelado cierta hiperactividad, propia de una disfunción del cortex prefrontal (Escorihuela et al., 1995; Reeves et al., 1995; Coussons-Read and Crnic, 1996; Holtzman et al., 1996).

Además, en el prosencéfalo basal, al igual que ocurre en los individuos con SD, se ha detectado una degeneración progresiva de las neuronas colinérgicas (BFCN, Basal Forebrain Cholinergic Neurons) a nivel del septum (Holtzman et al., 1996).

2.1.3. Ts1Cje

Un tercer modelo fue generado a partir del Ts65Dn de forma espontánea cuando se intentaba generar un ratón mutante para el gen *Sod1* (Sago et al., 1998). Este modelo trisómico parcial, contiene 86 genes del MMU16 en trisomía (de *Sod1-Znf295*, siendo *Sod1* no funcional). Estos ratones presentan fenotipos similares a los observados en el modelo Ts65Dn lo que permite acotar la región de los genes responsables de estas alteraciones, así como divergencias en la aparición de otros rasgos lo que facilitaría la correlación en aquellos genes no comunes en ambos modelos (de *Mrpl39* a *Sod1*). Entre los rasgos comunes, se encontrarían los de tipo neurológico (reducción de volumen cerebelar y de células granulares (Olson et al., 2004) y reducción de LTP y aumento de LTD (Siarey et al., 2005) y entre los rasgos divergentes se encontrarían la fertilidad masculina, la ausencia de rasgos dismórficos, ausencia de degeneración de las BFCN e hipoactividad (Sago et al., 1998). Recientemente se ha descrito en este modelo una disfunción mitocondrial en el cerebro y la hiperfosforilación de Tau (Shukkur et al., 2006).

2.1.4. Ms1Cje/Ts65Dn

Un cuarto modelo, llamado Ms1Cje/Ts65Dn (obtenido mediante cruces entre el modelo monosómico Ms1Cje y el trisómico Ts65Dn) incluye el resto de genes del MMU16 no cubiertos por el Ts65Dn, los 46 genes incluidos entre *App* y *Sod-1* (ver Esquema 2). Este modelo presenta menos similitudes con el fenotipo SD que los otros dos modelos trisómicos. Aún así se han detectado alteraciones a nivel cerebelar con una reducción en la densidad de las células granulares (Olson et al., 2004) y déficits en procesos de aprendizaje espacial menos severos que los presentados por los otros dos modelos (Sago et al., 2000).

2.1.5. Ts1Rhr

Modelo trisómico parcial para la región DSCR, la cual contiene 33 genes (Olson et al., 2007). Recientemente se ha descrito la presencia de alteraciones del volumen cerebelar al igual que en los otros modelos trisómicos (Aldridge et al., 2007).

2.1.6. Tc1

Modelo trisómico casi total, que presenta el 90% del cromosoma 21 humano extra. Originado mediante manipulación de células madre embrionarias (Fisher et al., 2005). El análisis fenotípico de estos ratones ha puesto de manifiesto alteraciones similares a las presentes en el SD, como las observadas en la densidad sináptica, en el número de neuronas cerebelares, en el desarrollo del corazón, en el tamaño mandibular o déficits de memoria y aprendizaje.

2.2. Modelos transgénicos de YACs, BACs y PACs

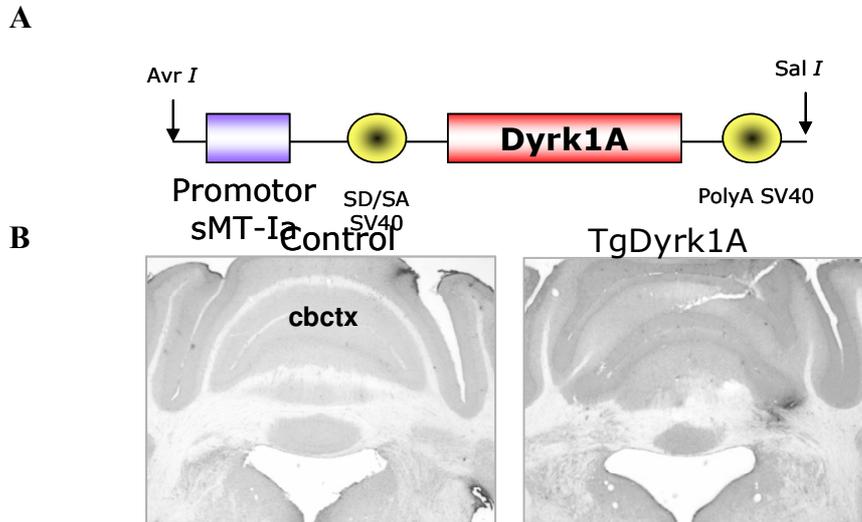
Estos modelos se generaron a partir de cromosomas artificiales de levadura (YAC, *Yeast Artificial Chromosome*), de bacteria (BAC, *Bacterial Artificial Chromosome*) y del bacteriófago P1 (PAC, *P1 bacteriophage Artificial Chromosome*) y contienen distintos fragmentos cromosómicos cubriendo aproximadamente 2 Mb del HSA21 (Smith et al., 1995). Entre los distintos modelos generados, cabe destacar el modelo transgénico YAC152F7tel, que contiene varios genes en transgénesis, entre ellos el gen DYRK1A, y que presentan alteraciones como hiperactividad durante el desarrollo, déficits en procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje, y un mayor volumen cerebelar (Branchi et al., 2004; Rachidi and Lopes, 2007).

2.3. Modelos transgénicos de genes únicos

Estos modelos presentan copias extras de genes del HSA21, o de sus homólogos en ratón o rata. Son utilizados para estudiar los efectos que comporta su sobreexpresión in vivo y la contribución que tienen en el conjunto de fenotipos presentes en el SD. Entre los ratones transgénicos de genes del HSA21, cabe citar algunos de gran importancia para estudiar fenotipos neurológicos como son: TgSim2 (Ema et al., 1999; Chrast et al., 2000), TgS100 β (Gerlai and Roder, 1995), TgSOD1 (Gahtan et al., 1998), TgAPP (Harris-Cerruti et al., 2004) TgEts2 (Sumarsono et al., 1996), TgDyrk1A (Altafaj et al., 2001) y DYRK1A BAC (Ahn et al., 2006).

2.3.1. Modelo TgDyrk1A

Este modelo, generado en nuestro laboratorio presenta en sobreexpresión el cDNA de *Dyrk1A* de rata, bajo el control del promotor heterólogo de la metalotioneína Ia bovina (psMT-Ia) (Altafaj et al., 2001).



Esquema 4. A) Constructo desarrollado para la generación de los ratones TgDyrk1A. B) Análisis inmunohistoquímico de Dyrk1A comparando el ratón TgDyrk1A con respecto al control. En la imagen se puede observar una mayor inmunorreactividad presente en la corteza cerebelar del ratón TgDyrk1A (extraído de Altafaj et al., 2001).

Se establecieron distintas líneas de ratones transgénicos observándose una expresión generalizada del transgén en todos aquellos tejidos estudiados (corazón, cerebro, hígado...). El estudio más detallado de la sobreexpresión de DYRK1A en el SNC mostró un patrón de localización de la proteína similar a la de los animales control. Esta sobreexpresión se detectó mayoritariamente en áreas motoras tanto del romboencéfalo (corteza cerebelar, núcleos profundos cerebelares o múltiples núcleos motores de la médula y del puente) como del mesencéfalo (diversos núcleos motores como el trigémino o el oculomotor).

El análisis de las alteraciones conductuales presentes en el modelo TgDyrk1A (Altafaj et al., 2001; Martínez de Lagran et al., 2004) reveló:

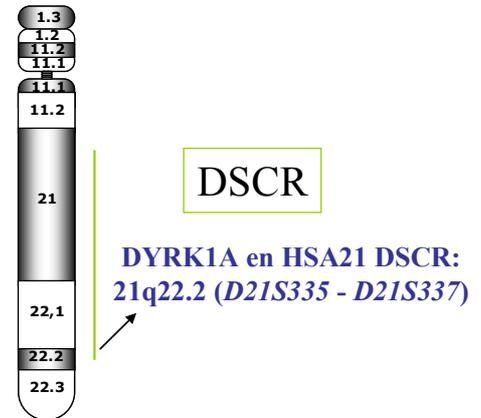
- Alteraciones en el neurodesarrollo: en forma de retraso de la adquisición de una actividad locomotora madura (Prueba de locomoción por pivotación, prueba de la marcha, prueba de “Homing”).

- Alteraciones en la coordinación motora, tanto en etapas del neurodesarrollo (Prueba del “*Wire suspension*”) como adultas (prueba de la percha o “*Coat hanger test*”, prueba de la cinta sinfín o “*Treadmill test*”)
- Hiperactividad: de intensidad moderada en condiciones aversivas (Prueba de campo abierto o “*Open field test*”, prueba del laberinto en cruz o “*Elevated Plus Maze test*”)
- Alteraciones en aprendizaje motor (Prueba del rodillo giratorio o “*Rotarod test*” y organización de comportamiento locomotor (Prueba de natación o “*Swimming test*”)
- Alteraciones en procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje, en concreto en la memoria de referencia (Prueba del laberinto de Morris o “*Morris water maze*”).
- Estas alteraciones pueden relacionarse con una disfunción en distintas estructuras cerebrales, como las relacionadas con distintos procesos motores (cerebelo, núcleo estriado o corteza motora), las relacionadas con inhibición de conducta espontánea (corteza prefrontal) o con alteraciones de memoria y aprendizaje (hipocampo).

Actualmente existe otro modelo de sobreexpresión única de Dyrk1A , el cual presenta en trisomía el gen DYRK1A humano completo clonado en un BAC. En este modelo se han reportado, por un lado, alteraciones en procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje como son LTP y LTD (Ahn et al., 2006), y por otro, se ha descrito en los cerebros de dichos animales, la hiperfosforilación de la proteína Tau en distintos residuos de treonina y serina (Ryoo et al., 2007), lo que implica a Dyrk1A en los procesos neuropatológicos de la enfermedad de Alzheimer, también presentes en los individuos con SD.

3. El gen **DYRK1A**

El gen **DYRK1A** (Dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1A) se localiza en la región cromosómica 21q22.2, en la región conocida como DCSR (Down Sndrome Critical Region). Su secuencia, de 150 kb, contiene 17 exones que codifican un transcrito mayoritario que dará lugar a una proteína de 763 aminoácidos (aa) (Guimera et al., 1999) con un peso molecular de 85,6 kDa. Por un mecanismo de splicing alternativo (exon-skipping) , se produce un segundo transcrito que dará lugar a una proteína de 754 aa.



Esquema 7. Localización genómica de Dyrk1A en la región DSCR

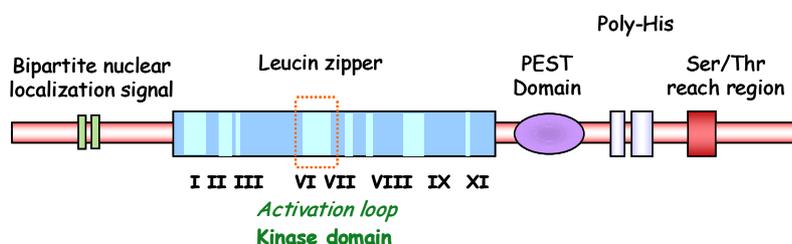
3.1. Familia de proteínas **DYRK**

Actualmente **DYRK1A** es el mejor caracterizado de entre todos los miembros de la cada vez más creciente familia **DYRK** de protein quinasas. La familia de las proteínas **DYRK**, evolutivamente muy conservada, se caracteriza por su especificidad dual, es decir que pueden fosforilar tanto a sus sustratos en residuos de serina o treonina (ser/thr) como autofosforilarse en residuos de tirosina (tyr) (Kentrup et al., 1996; Becker et al., 1998; Becker and Joost, 1999; Himpel et al., 2000). La actividad quinasa depende del motivo **YXY** (tirosina-x-tirosina) del dominio de activación, el cual se localiza en la misma posición que el característico dominio **TXY** (treonina-x-treonina) de las quinasas **MAPK** (Mitogen-activated protein kinase), lo que sugiere un mecanismo de activación similar al presentado por estas últimas (Himpel et al., 2000). Al menos 7 miembros de la familia **DYRK** han sido identificados en mamíferos (Guimera et al., 1996; Shindoh et al., 1996; Song et al., 1996; Guimera et al., 1999): **DYRK1A**, **DYRK1B**, **DYRK1C**, **DYRK2**, **DYRK3**, **DYRK4A**, **DYRK4B**. Todas ellas comparten el dominio quinasa y se sabe muy poco acerca de sus funciones a excepción de **DYRK1B**. Este ha sido muy estudiado en los últimos años. Estructuralmente, se sabe que comparte con **DYRK1A** además del dominio quinasa, el dominio **PEST** y el de localización nuclear bipartito (**NLS**). En cuanto a su función, se ha descrito su papel en la diferenciación del músculo esquelético (Deng et al., 2003) y, recientemente, como uno de los efectores de la vía de transducción de señales mediada por el oncogén **K-ras** en estudios realizados en líneas celulares derivadas de cáncer de páncreas (Jin et al., 2007).

3.2. Patrón de expresión de DYRK1A

Se ha descrito que la expresión de DYRK1A a nivel de mRNA es bastante ubicua tanto en tejidos fetales como adultos (Guimera et al., 1999). En estudios realizados en rata, se ha descrito una expresión alta de Dyrk1A en todos los tejidos en periodo embrionario que disminuye en las etapas postnatales excepto en cerebro y corazón donde se mantiene elevada (Okui et al., 1999). En un estudio inmunohistoquímico realizado en el SNC de ratón adulto, se observó una expresión generalizada en todas las áreas del cerebro con una mayor intensidad en estructuras como el bulbo olfatorio, la corteza cerebelar y estructuras funcionales asociadas, la médula espinal y diversos núcleos motores del mesencéfalo y del troncoencéfalo (Marti et al., 2003).

3.3. Estructura proteica de DYRK1A



Esquema 8. Estructura y dominios funcionales de Dyrk1A

El análisis de la secuencia primaria de DYRK1A muestra la conservación de los 11 subdominios (I-XI) característicos de la región catalítica de las proteínas quinasa. Entre los dominios VII y VIII se encuentra el *loop* de activación que contiene el motivo de autofosforilación Tyr-Xaa-Tyr (Tyr-319-Tyr-321) necesario para activar la funcionalidad de la quinasa (Himpel et al., 2001), dato puesto en duda recientemente en un estudio en el que se demuestra que no es necesaria la autofosforilación en Tyr-321 para que se dé la actividad enzimática de DYRK1A (Adayev et al., 2007). Otros dominios descritos son:

- 1) Una señal de localización nuclear bipartito (NLS) en el extremo N-terminal (aa 117- 134).
- 2) Un dominio PEST (Prolina, Glutámico (E), Serina y Treonina) rico en residuos de serina y treonina, situado en el extremo C-terminal. Es típico de proteínas que requieren un sistema de degradación rápida. Recientemente se ha descrito un sitio de autofosforilación en un residuo de serina (Ser- 520) necesario para la interacción con la proteína 14-3-3 β (Alvarez et al., 2007).

- 3) Una región rica en histidinas (13 Hys entre los aa 607 y 619), que funciona como una señal de direccionamiento al compartimento donde se acumulan los factores de splicing (SFC, *Splicing Factor Compartment*) o “*nuclear speckles*” (Alvarez et al., 2003).
- 4) Una región rica en residuos de serina y treonina (entre los aa 659 y 672).

3.4. Localización subcelular de DYRK1A

Se ha descrito la presencia de DYRK1A tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células. Inicialmente en una serie de estudios de transfección, se detectó la presencia de la proteína mayoritariamente en el núcleo, formando unas estructuras llamadas “speckles”(agrupaciones de proteínas nucleares que forman un patrón punteado irregular) (Becker et al., 1998), confirmando la hipótesis del direccionamiento de la proteína al núcleo mediada por las señales de localización nuclear. En las neuronas se ha propuesto una localización doble en el núcleo y en el citoplasma. En éste se ha observado una distribución perisomática aunque también se ha detectado en las dendritas proximales (Marti et al., 2003) y en sinapsis (Wegiel et al., 2004). La existencia de sustratos tanto citosólicos como nucleares confirma la doble localización de DYRK1A tanto en núcleo como en citoplasma sugiriendo la participación del gen en gran variedad de procesos celulares.

3.5. Función de DYRK1A

- *Estudio a partir de sus homólogos en otras especies*

Gran parte de lo que se conoce en relación a la función de esta quinasa proviene de analizar la función de sus homólogos en otras especies. Así Yak1P (*Saccharomyces cerevisiae*) (Wegiel et al., 2004), Pom1p (*Schizosaccharomyces pombe*) (Bahler and Pringle, 1998) y YakA (*Dictyostelium discoideum*) (van Es et al., 2001) en eucariotas inferiores se han relacionado con el control del crecimiento celular, y mnb (minibrain) en *Drosophila melanogaster* (Tejedor et al., 1995) se le ha atribuido un papel clave en la neurogénesis.

- *Estudio a partir de mutantes de función en otras especies*

El análisis de mutantes, tanto de pérdida como de ganancia de función ha permitido identificar posibles funciones de DYRK1A. Así, las moscas mutantes deficientes en mnb se caracterizan por una marcada reducción en el tamaño tanto de los lóbulos ópticos como de los hemisferios cerebrales en el adulto lo que ha permitido sugerir su papel en la neurogénesis (Tejedor et al.,

1995). En ratones, la anulación completa de DYRK1A es letal mientras que la inactivación de un sólo alelo presenta un retraso general del desarrollo acompañado de una reducción en el tamaño del cerebro y una marcada hipoactividad (Fotaki et al., 2002). Además, en este mismo modelo se ha observado un menor tamaño del árbol dendrítico con disminución significativa en el número de espinas dendríticas (Benavides-Piccione et al., 2005). Estos datos apuntan a un importante papel de DYRK1A en la fisiología del SNC, tanto en etapas de neurodesarrollo como adultas.

- ***Estudio a partir de su actividad quinasa y su interacción con otras proteínas***

La búsqueda de sustratos de la quinasa DYRK1A en los últimos años ha permitido la identificación de numerosas proteínas que son fosforiladas por DYRK1A, tanto citosólicas como nucleares (ver Tabla 4). Esta fosforilación se produce en residuos de serina o treonina, los cuales son precedidos por un residuo de prolina, por lo que el sitio consenso de fosforilación propuesto es: RPX (S/T)P. Se ha visto que en varios casos, la actividad quinasa de DYRK1A funciona como un primer paso de fosforilación del sustrato, el cual es fosforilado posteriormente en otro residuo por la quinasa GSK-3, por lo cual se le ha denominado a DYRK1A una “*priming kinase*” (Woods et al., 2001). La cada vez más creciente lista de sustratos de DYRK1A hace pensar en un efecto pleiotrópico de esta quinasa. A nivel del SNC, existen evidencias de un papel en la neurogénesis (Hammerle et al., 2002), diferenciación neuronal (Kang et al., 2005) y dendritogénesis (Hammerle et al., 2003). Este efecto de promover la diferenciación neuronal también ha sido descrito tras inducción por NGF (*Neural Growth Factor*) en células PC12, en un efecto independiente de la actividad quinasa de DYRK1A y mediado por la vía de señalización de Ras-MAPK (*Ras-mitogen activated protein kinase*) (Kelly and Rahmani, 2005). La fosforilación de otros sustratos típicamente expresados en SNC como Tau (Woods et al., 2001), APP (Park et al., 2007; Ryoo et al., 2007) o α -sinucleína (Kim et al., 2006) confirman la importancia de DYRK1A en la fisiología del SNC mientras que su sobreexpresión podría tener un efecto importante en diversas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Ferrer et al., 2005; Ryoo et al., 2007), Parkinson (Kim et al., 2006) o la enfermedad de Pick (Ferrer et al., 2005).

Otros efectos no necesariamente exclusivos del SNC son: la regulación del aparato endocítico a través de los sustratos dinamina-1, amfifisina y sinaptojanina1 (sólo en SNC); una regulación de la síntesis de glucógeno (Skurat and Dietrich, 2004); la regulación de la maquinaria de splicing por medio de la ciclina L-2 y el factor de splicing SF3b1/SAP155 (de Graaf et al., 2004; de Graaf et al., 2006); y la regulación de las vías controladas por la familia de factores de transcripción NFAT importantes en la regulación del desarrollo y organogénesis (Arron et al., 2006; Gwack et al., 2006). En el estudio de Arron et al. se muestra la sinergia existente entre dos genes del HSA21 como son

DYRK1A y DSCR1 en la modulación del circuito regulador mediado por NFAT y los efectos de una sobreexpresión de ambos genes en la desestabilización de ese circuito, lo que podría contribuir a explicar algunas de las alteraciones presentes en el SD. En otro estudio también se ha descrito la interacción de DYRK1A con la proteína wdr68 en un mutante de *Zebrafish* sugiriendo su implicación en el desarrollo craneofacial (Nissen et al., 2006).

SUSTRATO	LOCALIZACION SUBCELULAR	FUNCION	REFERENCIA
Histone H3	Nuclear	Formación de nucleosomas. Remodelación de la cromatina	(Himpel et al., 2000)
CREB (cAMP responsive element binding protein)	Nuclear	Desarrollo y diferenciación neuronal. Plasticidad sináptica	(Yang et al., 2001)
STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3)	Nuclear	Activación de transcripción	(Matsuo et al., 2001)
FKHR (Forkhead)	Nuclear	Control de la expresión génica mediada por insulina. Regulación de la apoptosis mediada por factores de supervivencia .	(Matsuo et al., 2001; von Grooten-Bidlingmaier et al., 2003; Chang et al., 2007)
Tau	Citosólica	Regulación de la dinámica de microtúbulos. Hiperfosforilada en enfermedad de Alzheimer	(Woods et al., 2001; Park et al., 2007; Ryoo et al., 2007)
GLI-1	Nuclear	Regulación transcripcional	(Mao et al., 2002)
eIF2Bε (Eukaryotic initiation factor 2Bepsilon)	Citosólica	Regulación del inicio de la traducción de mRNA	(Woods et al., 2001)
Dynamamin-1	Citosólica	Regulación del ensamblaje del aparato endocítico	(Chen-Hwang et al., 2002; Huang et al., 2004)
14-3-3	Nuclear/Citosólica	Regulación del andamiaje, protección de proteólisis, defosforilación y secuestro de proteínas diana	(Kim et al., 2004; Alvarez et al., 2007)
Arip4 (Androgen receptor-interacting protein 4)	Nuclear	Regulación de la transcripción inducida por hormonas esteroideas	(Sitz et al., 2004)
Cyclin L2	Nuclear	Regulación transcripcional relacionado con splicing de pre-mRNA	(de Graaf et al., 2004)
Glycogen synthase	Citosólica	Regulación del metabolismo de la glucosa	(Skurat and Dietrich, 2004)

Hip-1 (Huntingtin interacting protein)	Citosólica	Posible papel en endocitosis y el mantenimiento del citoesqueleto de actina	(Kang et al., 2005)
NFATc (Nuclear Factor of activated T cells c)	Nuclear/Citosólica	Regulación del desarrollo y organogénesis	(Arron et al., 2006; Gwack et al., 2006)
Amphiphysin I	Citosólica	Regulación del aparato endocítico	(Murakami et al., 2006)
α -Synuclein	Citosólica	Desconocida. Posible implicación en la regulación de la síntesis de dopamina. Formación de depósitos amiloides en enfermedad de Parkinson	(Kim et al., 2006)
Synaptojanin-1	Citosólica	Reciclaje de vesículas sinápticas endocíticas	(Adayev et al., 2006)
APP (Amyloid Precursor Protein)	Membrana/Citosólica/Nuclear	Migración de precursores neuronales. Degradación de β -catenina. Regulador transcripcional	(Park et al., 2007; Ryoo et al., 2007)

Tabla 4. Lista de sustratos de DYRK1A por orden cronológico de identificación (Adaptado y actualizado a partir de (Dierssen and de Lagran, 2006)

4. Receptores NMDA de glutamato

4.1. Definición y clasificación

El aminoácido L-glutamato actúa como el principal neurotransmisor excitador en el SNC de los vertebrados, actuando tanto sobre canales iónicos dependientes de ligando (receptores ionotrópicos) como sobre receptores acoplados a proteínas G o de unión a GTP (receptores metabotrópicos). Los estudios farmacológicos han permitido clasificar a los receptores a nivel funcional y han contribuido a entender la función de los diferentes tipos de receptores en la fisiología del SNC y su implicación en los distintos procesos patológicos. El grupo de receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) comprende tres grandes subgrupos farmacológicos: receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico), KA (ácido káinico) y NMDA (N-Methyl-D-Aspartato) (Sobolevsky et al., 2002).

Receptores no-NMDA: AMPA y KA

La familia de los receptores AMPA comprende 4 miembros (GluR1-4). Se caracterizan por presentar un componente excitatorio rápido en las sinapsis glutamatérgicas. Son importantes en determinar la excitabilidad postsináptica de la neurona debido a que la mayor parte del intercambio iónico en estado de reposo se produce a través de ellos. Generalmente, son impermeables al Ca^{2+} excepto aquellos que contienen la variante de la subunidad GluR2(Q). Los receptores de kainato forman heterodímeros de GluR5-7 y KA-1/2. Modulan la liberación de neurotransmisores a nivel presináptico. Al igual que los receptores AMPA, también son impermeables al Ca^{2+} . Ambos tipos de receptores constituyen canales que una vez activados, permiten el paso de iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} en determinados receptores.

Receptores NMDA

Estos reciben su nombre del compuesto químico cuya unión específica al receptor muestra mayor afinidad que la del propio glutamato. Dicha sustancia, la cual no se encuentra de manera natural en el organismo es el NMDA (N-Methyl-D-Aspartato) y fue descubierta en 1960. Desde entonces ha sido ampliamente utilizada como excitotoxina activando exclusivamente los receptores de glutamato de tipo NMDA.

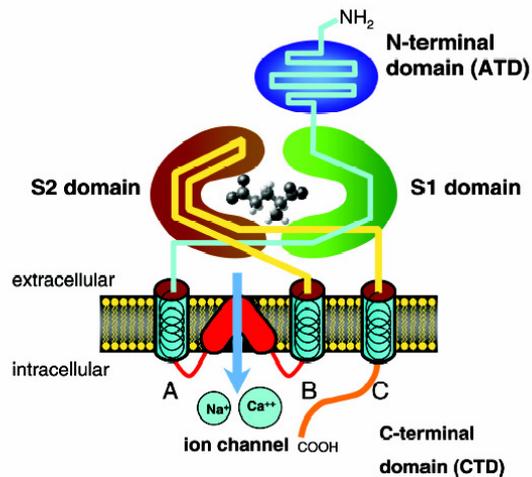
Los receptores de NMDA son de gran importancia para la conectividad y la plasticidad sináptica, procesos clave de fenómenos como la LTP (*Long Term Potentiation*) o la LTD (*Long Term Depression*), los cuales se han considerado cruciales en los procesos de formación de la memoria y el aprendizaje (Daoudal and Debanne, 2003).

Por otro lado, la entrada masiva de Ca^{2+} debida a una sobreactivación de los receptores conduce a un estado conocido como de “excitotoxicidad” especialmente deletéreo para la célula, en el cual se activan distintos mecanismos de muerte celular por apoptosis (Sattler et al., 1999). Muchos estudios han mostrado que la disfunción de los receptores de NMDA subyace a una gran variedad de desórdenes neurológicos desde el infarto cerebral hasta la neurodegeneración crónica en la esclerosis lateral amiotrófica.

4.2. Composición del receptor NMDA

Los receptores NMDA funcionan como tetrámeros heteroméricos compuestos por dos subunidades constitutivas NR1 y dos subunidades, que pueden ser NR2 (subtipos A, B, C o D), NR3 (A o B) o una mezcla de ambas (Villmann and Becker, 2007). Las subunidades NR2 y NR3 son las que confieren variabilidad funcional al receptor y permiten cambios en la composición tanto temporal (a lo largo del desarrollo) como espacial (en las distintas áreas cerebrales). Actualmente el conocimiento acerca de la composición estequiométrica del receptor se basa únicamente en estudios funcionales (Banke and Traynelis, 2003).

Cada subunidad consta de 3 dominios transmembrana (TMDs): A, B y C. La parte 3' del dominio N-terminal (dominio S1) y la secuencia en forma de bucle entre los TMD B y C (dominio S2) forman el dominio de unión a ligando. El dominio que forma el canal iónico (entre TMD A y B) se encuentra anclado en la membrana. Por último, se encuentra un dominio intracelular (extremo C-terminal) responsable de la interacción con otras proteínas intracelulares y crítico para la correcta expresión de las subunidades (Standley et al., 2000; Holmes et al., 2002).



Esquema 9. Estructura y dominios funcionales de una subunidad del receptor NMDA (extraído de Villmann & Becker, 2007)

La subunidad NR1 (NMDAR1) fue la primera subunidad del receptor en ser clonada (Moriyoshi et al., 1991). Presenta sitio de unión para la glicina. Actualmente se conocen 8 variantes de splicing que difieren básicamente en el extremo C-terminal y en la presencia/ausencia de un exón extra. Esto confiere distintas propiedades como la modulación por Zn²⁺, poliaminas y proteín quinasa C, así como la unión a proteínas intracelulares (Lin et al., 1998). Su expresión es ubicua en el SNC.

Las subunidades NR2 presentan 4 subtipos: A, B, C y D, codificadas por genes distintos. Presentan sitios de unión a glutamato. Determinan las propiedades biofisiológicas del canal, como la conductancia, el tiempo medio de apertura o la sensibilidad al bloqueo del Mg²⁺ (Monyer et al., 1992; Monyer et al., 1994). Diferencias en estas propiedades son un factor crítico para activar distintas vías de señalización postsinápticas, entre ellas las que determinan la plasticidad sináptica. En este sentido, por ejemplo, se ha observado que los receptores que contienen NR2A o NR2B están asociados a fenómenos de LTP o LTD, respectivamente (Liu et al., 2004; Massey et al., 2004), si bien estos resultados son controvertidos (Weitlauf et al., 2005; Morishita et al., 2007). La expresión de los distintos subtipos varía a lo largo del desarrollo del CNS y dependiendo de la estructura cerebral.

Las subunidades NR3 han sido las últimas en ser descritas y las menos estudiadas. Incluyen los subtipos NR3A y NR3B (Ciabarra et al., 1995; Nishi et al., 2001). Se ha visto que, cuando son coexpresadas junto con NR1 y NR2A, reducen la permeabilidad del Ca²⁺ (Matsuda et al., 2002; Sasaki et al., 2002) y cuando se producen triheterodímeros compuestos por NR3A, NR3B y NR1, sólo son activados por glicina y no por glutamato constituyendo un nuevo tipo de receptores de glicina con carácter excitatorio (Chatterton et al., 2002).

4.3. Expresión del receptor NMDA en el SNC

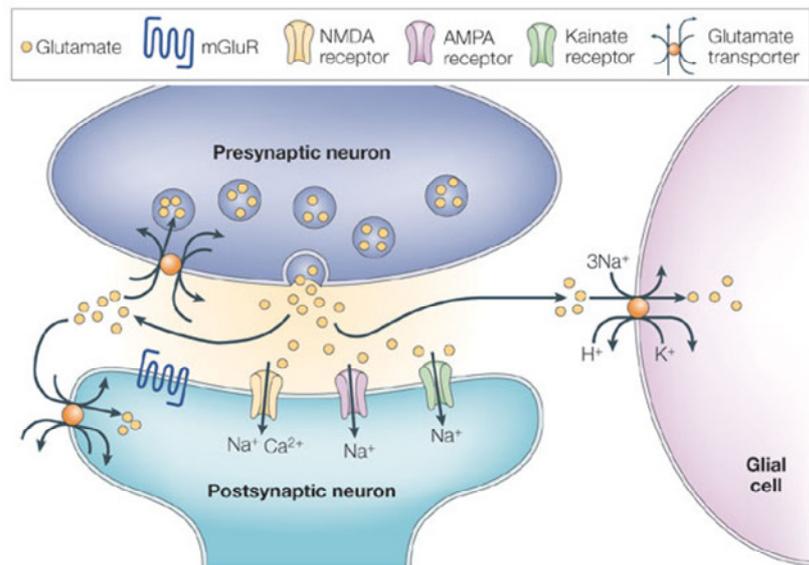
Los receptores NMDA se encuentran fundamentalmente en el SNC aunque estudios recientes han descrito su presencia también en oligodendrocitos (Karadottir et al., 2005), osteoclastos (Szczesniak et al., 2005) y linfocitos (Tuneva et al., 2003). La función en estos tres tipos celulares no se conoce.

La expresión de las distintas subunidades varía a lo largo del desarrollo. Mientras que la expresión de las subunidades NR2B y NR2D es alta en estadios tempranos del desarrollo y decae en etapas postnatales, la expresión de NR2A y NR2C aumenta a lo largo del desarrollo (Kohr, 2006). En el adulto, la expresión de NR2A es ubicua mientras que la de NR2B se da principalmente en prosencéfalo, la de NR2C en cerebelo y la de NR2D en pequeños grupos celulares distribuidos en áreas específicas del cerebro. Parece ser que las células granulares del cerebelo son las únicas células en las que se produce una falta total de expresión de NR2B, desplazada por la expresión de las subunidades NR2A y NR2C (Takahashi et al., 1996). Sin embargo, aunque durante el desarrollo la expresión de NR2A y NR2B tienda a aumentar o reducirse respectivamente, ambas subunidades coinciden en la formación de receptores en muchas áreas cerebrales. La combinación triheteromérica compuesta por NR1/NR2A/NR2B es la más frecuente en neuronas maduras del prosencéfalo (Luo et al., 1997). En cuanto a las subunidades NR3, se ha descrito que mientras que la expresión de NR3A decae en la segunda semana de desarrollo postnatal, la de NR3B perdura en el adulto en la médula espinal y en el troncoencéfalo. Mientras que NR3B se expresa típicamente en motoneuronas, la expresión de NR3A es más generalizada (Nishi et al., 2001).

La localización en la membrana plasmática también varía a lo largo del desarrollo. Mientras que el receptor NR1/NR2B es el mayoritario en las sinapsis en etapas prenatales, en la maduración se produce un cambio progresivo de localización de dichos receptores hacia sitios extrasinápticos. En su lugar, en las sinapsis, se expresarán receptores compuestos por NR1/NR2A/NR2B (Papadia and Hardingham, 2007).

4.4. Papel del receptor NMDA en condiciones fisiológicas

Existen al menos 5 sitios de unión que regulan la actividad del receptor y son: sitios de unión a 1) glutamato, 2) glicina, 3) magnesio (Mg^{2+}), 4) zinc (Zn^{2+}), 5) feniciclidina (PCP).



Esquema 10. Sinapsis excitatoria mediada por glutamato. (Adaptado de (Attwell and Gibb, 2005))

En estado de reposo, los receptores NMDA se encuentran bloqueados por el ión magnesio (Mg^{2+}). Para la activación de los receptores NMDA, tienen que ocurrir tres procesos simultáneamente: 1) la unión del ligando (glutamato) o de un agonista (i.e. NMDA); 2) la unión del coagonista (glicina); y 3) la despolarización de la membrana como consecuencia de la llegada de un potencial de acción (proceso dependiente de voltaje). La liberación del glutamato en la hendidura sináptica causa primero una entrada de Na^+ a través de los receptores AMPA en la neurona postsináptica lo cual despolariza parcialmente la membrana y es suficiente para quitar el bloqueo mediado por el Mg^{2+} . Como consecuencia, el canal del receptor NMDA se activa. La apertura de éste provoca una entrada de iones K^+ , Na^+ y Ca^{2+} hacia el espacio intracelular que, entre otros efectos, hace que se despolarice la membrana y pueda propagarse el potencial de acción (básico para la transmisión nerviosa). Sin embargo, la mayor parte de los efectos producidos por la entrada de Ca^{2+} se producen a nivel intracelular.

El Ca^{2+} como principal efector tras la activación de los receptores NMDA

Una de las características de los receptores de NMDA que los diferencia del resto de receptores de glutamato es que presentan una cinética de apertura/cierre muy lenta y una alta permeabilidad al Ca^{2+} . El flujo de entrada de Ca^{2+} resultante de la activación de estos receptores activa distintas vías de transducción de señales. Esta activación requiere de unas proteínas intermediarias agrupadas en

un complejo multiproteico que se halla unido a los receptores NMDA a través de los extremos C-terminales de las subunidades NR1 y NR2 (Collins et al., 2006). Este complejo facilita la localización del receptor en áreas específicas como la densidad postsináptica (*Postsynaptic density* o PSD) y facilita la conexión con una gran variedad de moléculas de señalización intracelular a través de las cuales se median muchos de los efectos causados por la activación de los receptores (Waxman and Lynch, 2005). Muchas de las proteínas presentes en la PSD, como PSD-95, SAP-102 (*Synapse-Associated Protein*) y PSD-93 contienen dominios PDZ de interacción con otras proteínas lo que lleva a la creación de una estructura muy organizada que facilita la transducción de señales al acercar por un lado, los enzimas citoplasmáticos encargados de la señalización celular y, por otro, los receptores de membrana. Un ejemplo de ello es la interacción de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y su interacción con PSD-95, que es eficientemente activada como consecuencia del flujo de entrada de Ca^{2+} mediado por los receptores NMDA (Aarts et al., 2002).

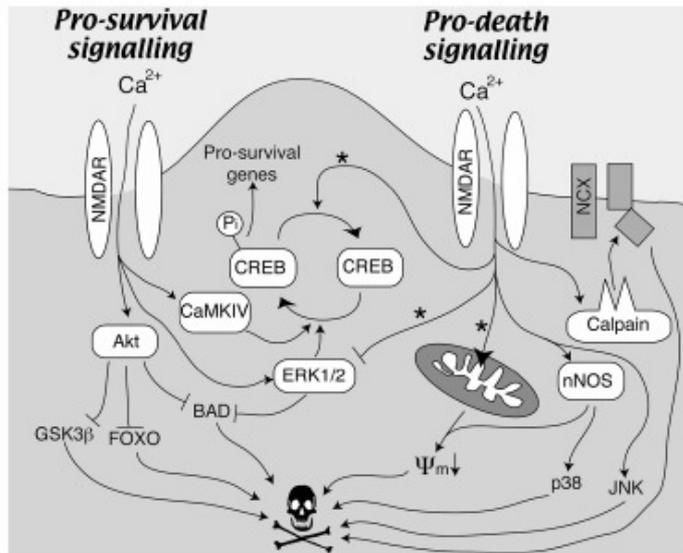
4.5. Papel del receptor NMDA en condiciones patológicas

La excitotoxicidad es el proceso por el cual se produce una sobreactivación de los receptores NMDA de glutamato seguida de una entrada masiva de Ca^{2+} dentro de la célula, lo que desencadena una serie de mecanismos intracelulares que llevan a la muerte celular por apoptosis. El aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular provocado tanto por la entrada masiva desde el medio extracelular como por la liberación por parte del retículo endoplasmático, es uno de los principales efectores de dicha muerte (Mody and MacDonald, 1995). El incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} produce una gran variedad de respuestas celulares que van desde el cambio de estado de fosforilación de diversas proteínas (proteasas, quinasas, fosfatasas y fosfolipasas) o variaciones en la regulación transcripcional, hasta alteraciones del metabolismo energético (Nicholls and Ward, 2000). También se ha descrito una depleción parcial de las reservas de ATP en las neuronas como consecuencia de alteraciones en la ATPasa mitocondrial que produciría la liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Nicholls, 2004) conocidos agentes neurotóxicos.

El daño producido por la excitotoxicidad se ha relacionado con la isquemia y el trauma cerebral, la inflamación, el daño neuropático o la epilepsia, mientras que en otras enfermedades tendría un papel secundario de sensibilización neuronal al daño excitotóxico como ocurre en las enfermedades de Alzheimer, Parkinson o Huntington. Esta implicación en numerosas patologías del SNC llevó a muchos grupos a investigar el potencial del receptor de NMDA como diana terapéutica. Sin embargo, en los últimos años, se ha comprobado la ineficacia terapéutica de los diversos antagonistas desarrollados llegando a suspenderse varios ensayos clínicos (Ikonomidou and Turski,

2002). Esta ineficacia podría ser debida a la interferencia de los antagonistas del receptor NMDA con el papel neuroprotector mediado por los propios receptores después de un episodio excitotóxico. Así los antagonistas del receptor NMDA estarían bloqueando las señales de supervivencia activadas tras el daño.

Dichas señales pueden estar mediadas por modificaciones postranscripcionales de proteínas o por expresión génica de novo. Se han descrito varias vías: la del PI3K (fosfoinositidil-3-quinasa)-Akt en la que la fosforilación de GSK3, FOXO (Forkhead box O) y BAD (miembro de la familia de Bcl-2) promueve la inhibición de vías apoptóticas; o la vía de Ras/Erk-CREB en la que la fosforilación de CREB por Ca^{2+} /calmodulina CAMKIV activaría la transcripción de genes implicados en vías anti-apoptóticas, entre los cuales se perfilan BDNF, Bcl2, citocromo-c o SOD-2 como buenos genes candidatos en este sentido (Papadia and Hardingham, 2007). Otros factores como la localización en membrana de los receptores NMDA (sináptica versus extrasináptica) o su composición (NR2A versus NR2B) (Liu et al., 2007) también se han descrito que intervienen en el destino neuronal (supervivencia versus muerte).



Esquema 11. Vías de supervivencia/muerte neuronal mediadas por la activación de receptores de NMDA (extraído de Papadia & Hardingham, 2007)

5. Terapia génica para enfermedades del SNC

La terapia génica para el SNC constituye una estrategia fascinante y prometedora tanto en investigación básica como en clínica, y que permite intervenir tanto en una neurona aislada en cultivo hasta en la compleja fisiología del cerebro. El concepto de terapia génica consiste en introducir material genético con el fin de restablecer el correcto funcionamiento de una célula alterado por el exceso o defecto en la expresión de algunas proteínas, y así curar o detener la progresión de una determinada enfermedad. Esta estrategia requiere de una tecnología capaz de transferir dicho material genético en el tejido u órgano de interés. Tanto el uso de vehículos virales (adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus etc...) como no virales (DNA desnudo, poliómeros catiónicos, liposomas) han demostrado su eficacia a la hora de introducir genes en neuronas maduras *in vitro* e *in vivo* permitiendo el desarrollo de numerosas estrategias de terapia génica para el tratamiento de enfermedades neurológicas (Lundstrom, 2007). Entre los vectores más utilizados para dirigir genes al SNC se encuentran algunos virus como: los lentivirus, los cuales son efectivos en transducir neuronas permitiendo la expresión del transgén durante largos periodos de tiempo, pero sin embargo presentan potencial oncogénico derivado de su integración en el genoma huésped (Cockrell and Kafri, 2007); los adenovirus, los cuales aportan una gran eficiencia de transducción de células quiescentes pero, por contra, presentan una gran inmunogeneicidad (Douglas, 2007); y los virus adenoasociados, los cuales presentan una baja inmunogeneicidad y permiten una expresión duradera del transgén, si bien tienen una limitada capacidad estructural para contener material genético.

Actualmente están en marcha ensayos clínicos para enfermedades como el Alzheimer (<http://www.gemcris.od.nih.gov>, protocol number 9906-322); la enfermedad de Parkinson, (<http://www.gemcris.od.nih.gov>, protocol number 0104-469) ; enfermedad de Canavan (<http://www.gemcris.od.nih.gov>, protocol number 0104-469); y varios para glioblastoma multiforme, uno actualmente en Fase III (Ark therapeutics, Inc).

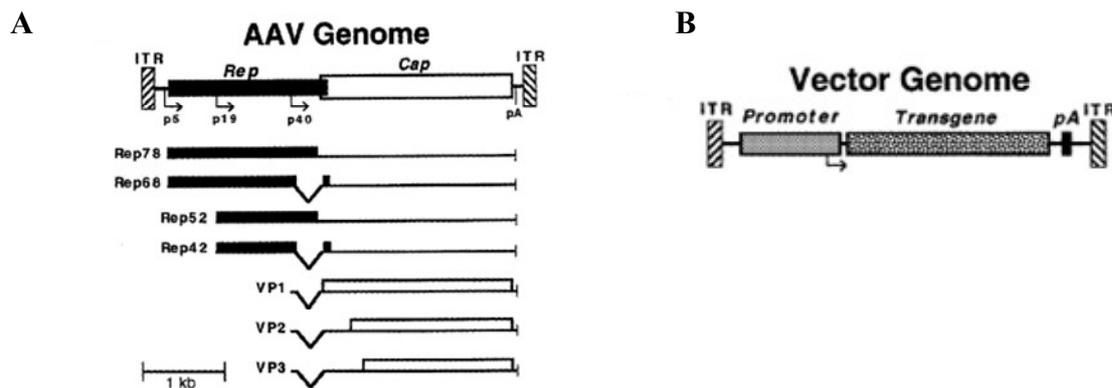
5.1. Virus adenoasociados (AAVs)

5.1.1. Generalidades de los AAVs

Los AAV pertenecen al género Dependovirus y a la familia *Parvoviridae*. Son virus pequeños (20-24 nm) sin envoltura lipídica y contienen DNA de simple cadena de 4.7 kb. No son patogénicos y son deficientes en replicación lo que significa que requieren de un virus *helper*

como un adenovirus o un herpes simplex virus, para completar la replicación viral. A falta de estos, el virus se mantiene latente, generalmente episómico, dentro de la célula. Son capaces de transducir gran variedad de tejidos y de tipos celulares in vivo, y de dirigir la expresión a largo término. Hasta la fecha se han descrito 8 serotipos diferentes y cada uno de ellos presenta un tropismo diferente cuando son inyectados en el cerebro. Además presentan baja inmunogeneicidad, aunque, como se explicará más adelante, este punto resulta controvertido últimamente.

El virus salvaje codifica para dos genes: *rep* y *cap*, los cuales son necesarios para la replicación y síntesis de las proteínas de la cápside, respectivamente. Por medio del uso de sitios de inicio de la traducción y de splicing alternativos, el genoma expresa 4 proteínas a partir del gen *Rep* y 3 a partir del gen *Cap* (VPs). Para la generación de un adenoasociado recombinante (rAAV) se sustituye el genoma viral por el cassette de expresión para el gen terapéutico deseado (ver Esquema 12).

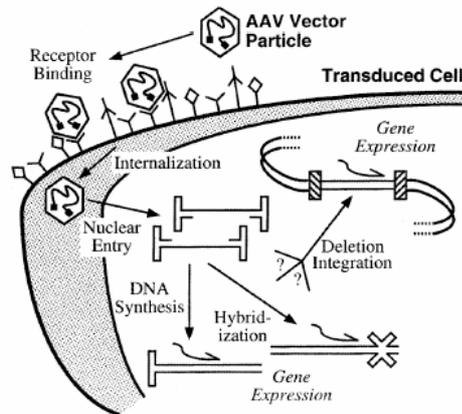


Esquema 12. A) Estructura genómica de un AAV salvaje (A) y de un AAV recombinante (B) (Lu, 2004)

Ciclo viral

Brevemente, el ciclo viral de un AAV (o rAAV) consiste en un primer paso de reconocimiento y unión del virus al receptor celular específico, seguido de la internalización facilitada por las interacciones con los correceptores. Posteriormente, el virus se transloca al núcleo evitando la vía de degradación mediada por los endosomas. Después o durante la entrada del virus al núcleo, éste se desencapsida y libera su genoma. En este punto, se produce la síntesis de la cadena complementaria de DNA y se produce la expresión de los genes virales (o del transgén). Finalmente, mientras el genoma viral de los virus recombinantes se mantiene episómico en el

núcleo de la célula, los AAVs salvajes se integran preferentemente en el cromosoma 19 humano (ver Esquema 12).



Esquema 13. Fases del ciclo viral de un AAV (Lu, 2004)

Serotipos

Actualmente se conocen 8 serotipos de AAV y más de 100 variantes. De entre los serotipos, los AAV-2, -3, -5 se cree presentan un origen humano mientras que los AAV-1, -4 provendrían de primates y los AAV-7 y AAV-8 de macacos. El AAV-6 vendría de una recombinación entre AAV-1 y AAV-2. El conocimiento acerca de los receptores celulares de los distintos serotipos es limitado, aún así, se sabe que el receptor de AAV-2 es el proteoglicano heparán sulfato (HSPG) y como correceptores se encontrarían la integrina $\alpha V\beta 5$, el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos FGFR1 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 1*) y el receptor del factor de crecimiento hepatocitario HGFR (Hepatocyte Growth Factor Receptor). También se ha descrito el ácido siálico como receptor de AAV-5 y AAV-4, y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGFR como correceptor para AAV-5. Recientemente se ha descrito la laminina 37/67-Kd como receptor de AAV-8.

El serotipo más estudiado y utilizado en terapia génica ha sido el AAV-2 aunque en los últimos años su uso se ha visto cada vez más desplazado por otros serotipos a medida que estos han sido caracterizados.

5.1.2. rAAV como vector de terapia génica para el SNC

Capacidad de transducción de los rAAVs en el SNC

Con la producción de los primeros AAVs recombinantes de serotipo 2 (rAAV-2) (McCown et al., 1996) se observó que estos eran capaces de transducir células post-mitóticas sin producir efectos tóxicos. Desde entonces, una de las áreas de gran interés para el uso de los rAAV ha sido el SNC. Estudios iniciales realizados en rata revelaron que los rAAV-2 transducían principalmente neuronas mientras que el resto de tipos celulares mostraban muy poca o nula transducción (Kaplitt et al., 1994; McCown et al., 1996). Resultados similares se observaron en el SNC del mono (During and Ashenden, 1998; Bankiewicz et al., 2000). A raíz de estos primeros estudios, pudo observarse que apenas se producía respuesta inmune contra el vector y que la expresión génica podía mantenerse más allá del año postinfección sin evidencias de muerte celular. Todas estas observaciones hacían de los rAAV-2 unos buenos vectores para la expresión de transgenes en la población neuronal del SNC.

Hasta la fecha, en la mayoría de los estudios de terapia génica se ha utilizado el serotipo 2 (AAV-2) pero en los últimos años, se ha testado la capacidad de transducción en el SNC de otros serotipos como AAV-1, AAV-4, AAV-5, AAV-7 y AAV-8 (Klein et al., 2002; Cucchiari et al., 2003; Broekman et al., 2006; Harding et al., 2006; Cearley and Wolfe, 2007; Taymans et al., 2007). Se ha observado que todos los serotipos presentan ciertas diferencias en el tropismo celular y en la capacidad de transducción. Así como rAAV-4 presenta un tropismo por las células ependimales del cerebro (Davidson et al., 2000), el resto de serotipos infectan las células del parénquima cerebral observándose diferencias en el área de transducción y en el tropismo celular. En distintos estudios realizados en el cerebro de ratón y rata, se ha descrito una mayor área de transducción por parte de rAAV-1 y rAAV-5 comparado con el rAAV-2 en áreas como núcleo estriado, hipocampo o sustancia nigra (Davidson et al., 2000; Passini et al., 2003; Wang et al., 2003a; Ahmed et al., 2004; Burger et al., 2004). Posteriormente, se ha observado que rAAV-7 y rAAV-8 presentan un área de transducción similar al descrito para rAAV-5 en distintas estructuras cerebrales (Taymans et al., 2007; Klein et al., 2008). En cuanto al tropismo celular, se ha descrito un tropismo específico neuronal para AAV-2, AAV-6, AAV-7 y AAV-8, mientras que AAV-1 y AAV-5 son capaces de infectar neuronas mayoritariamente pero también una cierta proporción de células gliales (ver Tabla 5).

Serotipo AAV	Áreas SNC			Transporte retrógrado	Tropismo celular	Referencias
	Striatum	Hipocampo	Substantia nigra			
AAV-1	++++	++++	++++	++	N/G	(Davidson et al., 2000; Burger et al., 2004; Shevtsova et al., 2005; Harding et al., 2006; Cearley and Wolfe, 2007; Taymans et al., 2007)
AAV-2	+	+	+	-	N	
AAV-5	+++	+++	+++	+++	N/G	
AAV-7	+++	+++	++++	++	N	
AAV-8	+++	+++	++++	++	N	
AAV-4	++	nd	nd	nd	nd	
AAV-6	+	nd	nd	nd	N	

Tabla 5. Serotipos de AAVs. Tropismo celular y capacidad de transducción en determinadas áreas cerebrales del SNC. nd: no disponible; N: neuronas ; G: células gliales.

Mejora de la capacidad de transducción de los rAAVs en el SNC

En paralelo al descubrimiento y caracterización de nuevos serotipos, se han realizado numerosos estudios encaminados a optimizar la especificidad y la eficiencia de transducción con los rAAVs. Por ejemplo, se ha estudiado la influencia de distintos promotores sobre la expresión génica mediada por los rAAVs observándose que, por un lado, un mismo promotor como el CMV presentaba una persistencia diferencial de expresión dependiendo del área cerebral transducida (McCown et al., 1996) mientras que el uso de otros promotores específicos como el de la enolasa específica neuronal (NSE), permitían obtener una expresión más duradera a la par que incrementaba la especificidad de la transducción en la población neuronal (Klein et al., 1998b). Otro punto al que se prestó especial atención para evitar casos de toxicidad mediada por la expresión del transgén fue el control exógeno de la expresión génica mediante el uso de sistemas regulables como el sistema TET-on/TET-off regulado por administración oral de doxiciclina (Haberman et al., 1998) o el uso de aisladores (*insulators*) para impedir la interferencia mediada por las secuencias terminales repetidas (ITRs) del genoma viral (Fitzsimons et al., 2001). El uso de rAAVs quiméricos, que presentan el genoma de un serotipo y la cápside de otro, o bien dominios o aminoácidos específicos de la cápside intercambiados con otros serotipos, o de rAAVs mosaicos que presentan cápsides compuestas de una mezcla de subunidades de distintos serotipos, ha facilitado la eficiencia de transducción y potencian la expresión del transgén en determinados tejidos (Wu et al., 2006). El uso de rAAVs de doble cadena (McCarty et al., 2003; Wang et al., 2003b) ha permitido obtener una mayor eficiencia de transducción que los de simple

cadena e incluso se han utilizado en varios estudios preclínicos de terapia génica (Rehman et al., 2005; Grimm et al., 2006; Sagazio et al., 2008).

Inmunogeneicidad de los rAAVs en el SNC

La idea de la baja inmunogeneicidad inducida por los rAAVs sufrió un vuelco el año pasado cuando en un ensayo clínico para hemofilia B en el cual se inyectaron rAAV-2 directamente en hígado, se detectó en 2 pacientes una activación de la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8⁺ contra los hepatocitos transducidos (Mingozzi et al., 2007). Este efecto, que no se había observado en los modelos murinos preclínicos pone de manifiesto las diferencias existentes entre ambas especies y alerta sobre la extrapolación de resultados. En ese mismo estudio también se detectó la presencia de células CD8⁺ en donantes sanos, posiblemente debido a infecciones con AAVs salvajes. Esto está acorde con el hecho de que entre el 50 y el 96% de la población humana presenta anticuerpos neutralizantes contra los AAV-2 (Warrington and Herzog, 2006). En el caso del SNC, la presencia de la barrera hematoencefálica prácticamente impide la entrada de las células del sistema inmune lo que convierte al cerebro en un órgano inmunoprivilegiado a excepción de la microglía residente, encargada de la respuesta inmune innata mayoritariamente no inflamatoria, del cerebro. Sin embargo, en determinadas condiciones patológicas, se produce el infiltrado de dichas células dentro del cerebro dando lugar a procesos inflamatorios. Recientemente, en un ensayo clínico para la enfermedad de Canavan, en el que se inyectaron AAV-2 directamente en el cerebro de pacientes, se observó en sólo 3 de los 10 individuos sometidos al ensayo la presencia de cantidades moderadas de anticuerpos neutralizantes en la sangre y no así en el líquido cefalorraquídeo (McPhee et al., 2006). Aún así es necesario un seguimiento a largo plazo de los pacientes para controlar una posible activación del sistema inmune.

Uso de los rAAVs en terapia génica para el SNC

Todos estos datos señalan la importancia de un análisis y un control exhaustivo de la posible respuesta inmune provocada por el vector o el transgén expresado a la hora de considerar la terapia génica con rAAVs como totalmente segura en términos de inmunogeneicidad. Con todo ello, estos vectores se han utilizado con éxito en muchos estudios preclínicos y en algún ensayo clínico en fase I de terapia génica para enfermedades neurológicas. A continuación se resumen brevemente:

Enfermedad de Alzheimer: estrategias encaminadas a la expresión exógena de NGF (Klein et al., 1998a; Mandel et al., 1999) o de anticuerpos anti- β amiloide (Hara et al., 2004; Fukuchi et al., 2006; Levites et al., 2006).

Enfermedad de Parkinson: estrategias encaminadas a la expresión exógena de factores neurotróficos como GDNF (Mandel et al., 1997; Ozawa et al., 2000; Eslamboli, 2005), dopamina (Li et al., 2006) o enzimas como tirosina hidroxilasa y/o descarboxilasa de ácidos aromáticos (Kaplitt et al., 1994; During et al., 1998; Bankiewicz et al., 2000; Muramatsu et al., 2002; Sanftner et al., 2004; Forsayeth et al., 2006). Actualmente está en marcha un ensayo clínico en fase I en el que inyectaron directamente en el núcleo subtalámico de 12 pacientes virus rAAV-2 que expresan los enzimas GAD-65/GAD-75 necesarios para la síntesis de GABA. Tres meses después de la intervención se registró una mejoría en el fenotipo motor que perduró hasta los 12 meses (Feigin et al., 2007; Kaplitt et al., 2007).

Esclerosis amiotrófica lateral: estrategias encaminadas a la expresión exógena de factores neurotróficos como GDNF o IGF-1 (Wang et al., 2002; Kaspar et al., 2005), genes antiapoptóticos como Bcl-2 (Azzouz et al., 2000) o estrategias de RNA de interferencia contra alelos mutantes del gen SOD-1 (Miller et al., 2005).

Enfermedad de Canavan (un tipo de leucodistrofia infantil): estrategias encaminadas a la expresión exógena del enzima aspartoacilasa (ASPA) (Matalon et al., 2003; Klugmann et al., 2005a; McPhee et al., 2005). Actualmente está en marcha un ensayo clínico en fase I en el que se inyectaron en 6 puntos diferentes del cerebro de 10 pacientes rAAV-2 que expresaban el cDNA de ASPA (McPhee et al., 2006).

Epilepsia: estrategias encaminadas a la expresión exógena de péptidos como galanina (Haberman et al., 2003; Lin et al., 2003) o neuropéptido Y (NPY) (Richichi et al., 2004), de la proteína homer1a (Klugmann et al., 2005b) o estrategias de inmunización oral con AAVs que expresan la subunidad NR1 del receptor NMDA (During et al., 2000).

Enfermedad de Huntington: estrategias encaminadas a la expresión exógena de factores neurotróficos como BDNF O GDNF (McBride et al., 2003; Kells et al., 2004) o estrategias de RNA de interferencia contra alelos mutantes del gen de la huntingtina (Harper et al., 2005; Rodriguez-Lebron et al., 2005).

Enfermedades por almacenamiento lisosomal: 1) la mucopolisacaridosis de tipo VII (MPS VII); estrategias encaminadas a la expresión exógena del enzima de la β -Glucuronidasa (GUSB) (Elliger et al., 1999; Skorupa et al., 1999; Bosch et al., 2000; Sferra et al., 2000; Frisella et al., 2001; Passini and Wolfe, 2001; Heuer et al., 2002; Passini et al., 2003)). 2) mucopolisacaridosis de tipo IIIA; expresión exógena de los genes sulfamidasa y SUMF1 (Fraldi et al., 2007).

Todos estos estudios realizados en modelos preclínicos y los resultados de los primeros ensayos clínicos validan el uso de los rAAVs como vectores seguros y eficientes para la terapia génica para enfermedades del SNC y apuntan a un futuro prometedor en su uso clínico. Para ello, hoy en día, numerosos estudios tienen como objetivo incrementar la eficiencia de transducción de los distintos serotipos de rAAVs, aumentar la persistencia de la expresión del transgén y evitar completamente la respuesta inmune.

5.2. RNA de interferencia

Un gran número de enfermedades del SNC son consecuencia de la sobreexpresión de uno o más genes específicos o de la expresión de alelos anómalos. El uso de una herramienta potente como es la tecnología del RNA de interferencia ofrece la oportunidad para inhibir de forma específica transcritos involucrados en dichas enfermedades.

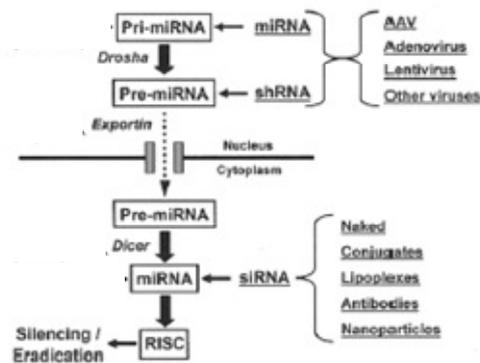
5.3.1. Historia del RNA de interferencia

El proceso del RNA de interferencia (RNAi) fue descubierto por primera vez en *C. elegans* en 1998, cuando se detectó el silenciamiento específico de genes tras la inyección de moléculas de doble cadena de RNA (dsRNA, *double-stranded RNA*) cuya secuencia era homóloga a la del gen diana (Fire et al., 1998). En mamíferos, inicialmente se pensó que el mecanismo no funcionaría debido a la existencia de la activación de la vía mediada por interferón como respuesta a la presencia de dsRNA en la célula, vía que conlleva la parada en la síntesis de nuevas proteínas (McManus and Sharp, 2002). Sin embargo, en el 2001, varios estudios mostraron que pequeños fragmentos de RNA de doble cadena, de 21 a 22 nucleótidos, llamados pequeños RNAs interferentes (siRNAs o *small interfering RNAs*) eran capaces de inhibir la expresión génica y escapar de la respuesta mediada por interferón (Caplen et al., 2001; Elbashir et al., 2001). Poco tiempo después, se demostró que la expresión de los siRNAs en forma de una molécula de RNA plegada en forma de horquilla (shRNAs o *short hairpin RNAs*) era capaz de inducir el silenciamiento específico de genes por el mismo mecanismo (Paddison et al., 2002). Este avance ofreció la posibilidad de conseguir una inhibición de la expresión más

estable y duradera mediante el uso de plásmidos codificantes para shRNAs, y en última instancia, de vectores dirigidos a tejidos u órganos de forma específica, hecho que amplió el potencial terapéutico de estrategias basadas en la activación de la vía de interferencia del RNA.

MicroRNAs

Otro hallazgo importante fue el descubrimiento que el mecanismo de RNAi no sólo tenía una función como respuesta antiviral sino que además era utilizado para la regulación de la expresión génica de secuencias que transcribían RNAs cortos de doble cadena. Así, se identificaron en el genoma de los mamíferos los microRNAs (miRNAs). Las principales diferencias con respecto al mecanismo utilizado por los siRNAs o shRNAs es que no requieren una perfecta complementariedad de bases para unirse al transcrito diana y que la inhibición no se da por una degradación de éste sino por una represión en la traducción de nuevos transcritos. La maquinaria utilizada para el procesamiento tanto de los miRNAs como de los shRNAs y siRNAs se muestra en el esquema 14. Se cree que unos 1000 miRNAs puedan estar codificados en el genoma y que podrían estar regulando alrededor de un 30% de los genes (Lewis et al., 2005). Actualmente, la progresiva identificación de unos y otros ha supuesto una revolución en el mundo científico. Concretamente, en el campo de la terapia génica, los microRNAs no sólo se han convertido en potenciales dianas terapéuticas al haber sido hallados sub o sobrerregulados en diversas enfermedades (Marquez and McCaffrey, 2007; Zhang and Farwell, 2007) sino que también presentan gran valor como arma terapéutica. En este caso, el uso vendría dado tanto por el efecto inhibidor intrínseco de los microRNAs (Scott et al., 2007) como por el uso de constructos que contienen dianas para determinados microRNAs. Esta estrategia permite por ejemplo evitar la expresión del transgén terapéutico en tejidos no deseados (Brown et al., 2006). Para algunas patologías, la modulación de miRNAs, los cuales son determinantes en la regulación de grupos de genes, se prevé como una estrategia más efectiva que la inhibición de la expresión de genes únicos.



Esquema 14. Vía del RNA de interferencia en mamíferos (y opciones terapéuticas). Adaptado de (Grimm and Kay, 2007)

5.3.2. Mecanismo del RNAi

El mecanismo de degradación de moléculas de mRNA mediado por RNAi es activado por moléculas precursoras de doble cadena de RNA (dsRNA) (ver Esquema 13). Mientras que los miRNAs y los shRNAs se generan en el núcleo como resultado de la transcripción, los siRNAs quedan restringidos al citoplasma. Los pri-miRNAs empiezan a ser procesados en el núcleo por un enzima llamado *Drosha*, tras lo cual los pre-miRNA son exportados, al igual que los shRNAs, al citoplasma por un mecanismo mediado por exportinas. Una vez en el citoplasma los pre-miRNAs son procesados en miRNAs por una segunda endonucleasa llamada *Dicer* y como resultado, se generan pequeños fragmentos de 21-23 nt de largo. En este punto, las moléculas de shRNA, siRNA o miRNA son incorporadas al complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*). Una vez ahí y en cualquiera de los tres casos, la secuencia guía *antisense* es incorporada al complejo mientras que la complementaria es destruida. La secuencia guía podrá entonces reconocer específicamente a su mRNA diana, lo cual acabará conduciendo a la ausencia de síntesis proteica mediante dos vías dependiendo de si se da una complementariedad total o parcial entre las dos secuencias: degradación del mRNA en pequeños fragmentos o bloqueo de la maquinaria de traducción, respectivamente.

5.3.3. RNAi como herramienta de silenciamiento

Un aspecto importante del RNAi como herramienta de silenciamiento reside en su diseño. Tanto los siRNAs como los shRNAs son diseñados para un silenciamiento óptimo de su diana a la vez que para evitar posibles efectos inespecíficos. Primero se sugirió el uso de fragmentos de 21 pares de bases con 2 bases sobresalientes en el extremo 3' además de una serie

de instrucciones para obtener una mayor eficiencia como eran la composición en G-Cs (guaninas-citosinas), la posición relativa de la secuencia dentro del gen o el uso de bases específicas en medio de la secuencia (Elbashir et al., 2001; Elbashir et al., 2002). Desde entonces, las propuestas relativas a un diseño óptimo han sido muchas hasta que recientemente, un análisis a gran escala de más de 24000 secuencias humanas de siRNAs usando un algoritmo, ha revelado unos estándares en el diseño racional de siRNAs que ayudan a predecir secuencias de siRNAs con gran especificidad y eficiencia (Huesken et al., 2005).

La síntesis *in vitro* de siRNAs y su posterior transfección en cultivos celulares de mamífero enseguida se convirtió en un método rutinario para estudiar las consecuencias de la pérdida de función génica. La generación de plásmidos codificantes para shRNAs ha permitido desde el establecimiento de líneas celulares “silenciadas” estables hasta generar modelos transgénicos “silenciados” (*knock-down*). En el campo de la neurociencia, la técnica del RNAi ha sido ampliamente utilizada para estudiar la función de genes tanto en numerosos procesos neurobiológicos y neuropatológicos. También se ha utilizado para la generación de modelos murinos de enfermedades como el Parkinson (Hommel et al., 2003) o la esclerosis lateral amiotrófica (Xia et al., 2006). Por último, el uso del RNAi como herramienta terapéutica se ha centrado en los últimos 5 años en la investigación de tratamientos para las infecciones virales, el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas y oculares.

5.3.4. Uso del RNAi como herramienta de terapia génica para el SNC

Un aspecto importante en relación al uso de RNAi *in vivo* con fines terapéuticos es la manera de hacer llegar los siRNAs al SNC. El uso de siRNAs es interesante por su casi nula inmunogenicidad pero sin embargo tienen: una baja selectividad celular, una estabilidad limitada en suero y dificultades de cruzar la barrera hematoencefálica. Con el fin de evitar estas limitaciones, se han incorporado modificaciones químicas como la conjugación al colesterol (Soutschek et al., 2004), uniones de grupos fosforilato, modificaciones en la posición 2' de las ribosas, el uso de LNAs (*Locked nucleic acids*) o encapsulación en nanopartículas de ciclodextrina (Heidel et al., 2007), lo que permite aumentar la estabilidad en suero. Por otro, para facilitar el paso a través de la barrera hematoencefálica se han usado estrategias como vectores liposómicos pegilados conjugados a anticuerpos específicos para receptores del endotelio vascular de la barrera (Boado, 2005; Xia et al., 2007) o la conjugación a través de un nonúmero de argininas a una glicoproteína del virus de la rabia que se une específicamente al receptor de acetilcolina (Kumar et al., 2007).

El potencial terapéutico del RNAi para el tratamiento de enfermedades neurológicas se ha demostrado en diversos estudios preclínicos que incluyen desde enfermedades causadas por infecciones virales hasta enfermedades genéticas (ver Tabla 6). Así, varios estudios realizados sobre modelos murinos de enfermedades causadas por expansión de poliglutaminas (polyQ) como son la ataxia espinocerebelar de tipo 1 (SCA-1) y la enfermedad de Huntington fueron los primeros donde el RNAi demostró efectos terapéuticos en modelos murinos in vivo (Xia et al., 2004; Harper et al., 2005). La estrategia consistió en inyectar rAAV-1 que expresaban un shRNA contra el transgén humano de la ataxina-1 en el cerebelo de los ratones transgénicos. Como resultado, pudo observarse no sólo una mejoría en la morfología cerebelar sino también la corrección de alteraciones en la coordinación motora presentes en el modelo transgénico (Xia et al., 2004). En el segundo estudio, se inyectaron rAAV-2 que expresaban un shRNA contra una variante mutada del gen de la huntingtina, tanto en el núcleo estriado como en el cerebelo. Los resultados mostraron una mejoría en la morfología tanto estriatal como cerebelar y correcciones en el fenotipo motor de los ratones transgénicos (Harper et al., 2005). Otros estudios realizados sobre modelos preclínicos donde el RNAi ha mostrado su eficacia son los dirigidos al tratamiento de enfermedades como la esclerosis lateral amiotrófica familiar (ELA familiar) (Ralph et al., 2005; Raoul et al., 2005; Xia et al., 2006), Parkinson (Sapru et al., 2006), Alzheimer (Singer et al., 2005)), dolor neuropático (Dorn et al., 2004; Tan et al., 2005) enfermedades priónicas (Pfeifer et al., 2006); glioblastoma multiforme (Takahashi et al., 1996; Zhang et al., 2004; Grzelinski et al., 2006) e incluso para trastornos neuropsiquiátricos como la depresión (Thakker et al., 2004). Es interesante mencionar una estrategia descrita recientemente en un estudio preclínico enfocado al tratamiento de la retinitis pigmentosa (O'Reilly et al., 2007), útil para aquellas enfermedades dominantes causadas por distintas mutaciones de ganancia de función en el mismo gen y para las cuales el desarrollar terapias individualizadas para cada una de dichas mutaciones sería técnicamente complicado y económicamente inviable. Dicha estrategia consiste en una acción doble y simultánea: por un lado inhibir la expresión mediante shRNA tanto del alelo mutado como del salvaje; y por otro, reemplazar la expresión del alelo salvaje con una nueva variante que contiene una modificación silente en un codón para evitar la acción inhibitoria del shRNA. De esta manera podría utilizarse una secuencia diana de silenciamiento común a todas las variantes alélicas, tanto salvajes como mutadas, de un mismo gen.

Enfermedad	Gen diana	Estrategia	Referencias
<i>Neurodegenerativas</i>			
SCA1	Ataxina-1 ^{82Q}	AAV-shRNA / inyección intracerebral	(Xia et al., 2004)
SCA3/MJD	Ataxina-3 ^{Q166}	Ad-shRNA (alelo-específico) / intracerebral	(Miller et al., 2003)
EH (<i>Enfermedad de Huntington</i>)	Huntingtina ^{N171-82Q}	AAV-shRNA / intracerebral	(Harper et al., 2005)
ELA (<i>Esclerosis lateral amiotrófica</i>)	SOD1 ^{G93A}	LV-shRNA / intraespinal	(Raoul et al., 2005)
	SOD1 ^{G93A}	LV-shRNA/ intramuscular	(Ralph et al., 2005)
EA (<i>Enfermedad de Alzheimer</i>)	BACE-1	LV-shRNA/ intracerebral	(Singer et al., 2005)
Enfermedades priónicas	PrP ^C	LV-shRNA/ intracerebral	(Pfeifer et al., 2006)
Distonia T1	Torsina A	LV-shRNA/ intracerebral	(Gonzalez-Alegre et al., 2003)
<i>Dolor</i>			
Dolor neuropático	P2X ₃	siRNA (desnudos)/ intratecal	(Dorn et al., 2004)
	NR2B	PEI-siRNA/ intratecal	(Tan et al., 2005)
	DOR	lipido-catiónico siRNA/intratecal	(Luo et al., 2005)
<i>Cáncer</i>			
Glioblastoma	PTPzeta/RPTPbeta	Céls tumorales transfectadas ex-vivo	(Ulbricht et al., 2006)
	Pleiotropina	PEI-siRNA/ intratumoral	(Grzelinski et al., 2006)
	EGF-R	PEG-Inmunoliposomas-siRNA/ intravenoso	(Zhang et al., 2004)
<i>Trastornos neuropsiquiátricos</i>			
Depresión	SERT	siRNA/ intraventricular	(Thakker et al., 2004)

Tabla 6. Estudios de RNAi en modelos murinos preclínicos de enfermedades neurológicas

Todos estos estudios preclínicos avalan el uso del RNAi como estrategia terapéutica para inhibir la expresión de genes involucrados en distintas enfermedades del SNC. Actualmente existen ya dos ensayos clínicos en los cuales el tratamiento está basado en el RNAi, uno dirigido a un tipo

de ceguera causada por una degeneración macular en el cual se inyectan siRNAs en el humor vítreo dirigidos al receptor de VEGF y el otro dirigido al tratamiento de una infección viral mediada por el virus respiratorio sincitial (VRS) en el cual se administran siRNAs mediante un spray nasal. El primero ha finalizado actualmente la fase II con resultados prometedores que incluyen una restauración parcial de la visión y una reducción del tamaño de la lesión.

Efectos tóxicos e inespecíficos del RNAi

Sin embargo, hay algunas consideraciones a tener en cuenta, surgidas de diversos estudios realizados en los últimos años y son la presencia de efectos tóxicos y/o inespecíficos (*off-target effects*) derivados del uso del RNAi. Como efectos tóxicos detectados estarían la activación de la respuesta mediada por interferón tras transfección de siRNAs en células (Bridge et al., 2003; Sledz et al., 2003) o la estimulación de células dendríticas mediante el receptor TLR7 tras inyección sistémica de siRNAs (Hornung et al., 2005). Con respecto a los efectos inespecíficos, algunos estudios realizados in vitro han mostrado la aparición sistemática de transcritos que son inhibidos de forma inespecífica tras transfectar bien con siRNAs o shRNAs (Birmingham et al., 2006; Jackson et al., 2006). La causa sería la complementariedad existente entre una secuencia de 6 a 7 pares de bases de la cadena guía *antisense* de aquellas moléculas y secuencias localizadas en regiones 3'UTR. Este fenómeno que recuerda al mecanismo utilizado por los miRNAs, podría estar detrás de los efectos inespecíficos detectados muy recientemente en un estudio de terapia génica in vivo en el que detectan la inhibición de transcritos inespecíficos (Denovan-Wright et al., 2008). En otro estudio también de terapia génica, se ha mostrado también que altas dosis de shRNAs o siRNAs dentro de la célula puede llevar a la saturación de la maquinaria del RNAi y alterar la regulación mediada por los miRNAs endógenos, produciéndose incluso la muerte del organismo (Grimm et al., 2006).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis ha sido desarrollar una estrategia de terapia génica basada en la interferencia de RNA para reducir de forma específica la expresión de Dyrk1A y estudiar el efecto que variaciones en la expresión de Dyrk1A in vivo provoca sobre la expresión y funcionalidad de los receptores NMDA y sobre el fenotipo motor en el ratón. Los objetivos concretos han sido:

1. Caracterización de la expresión de las subunidades del receptor NMDA de glutamato en el cerebelo y en el núcleo estriado del ratón TgDyrk1A. Estudios in vivo, a distintos estadios (P7, P14 y adulto) e in vitro, sobre células granulares de cerebelo (CGN).
2. Análisis funcional de la actividad del receptor NMDA en el modelo TgDyrk1A y de la susceptibilidad a un estímulo excitotóxico.
3. Caracterización del fenotipo motor de los ratones TgDyrk1A.
4. Desarrollo de una estrategia de terapia génica basada en el RNA de interferencia dirigido a reducir la expresión de Dyrk1A en el modelo TgDyrk1A.
5. Estudio de los efectos de la reducción de Dyrk1A sobre el fenotipo motor de los ratones TgDyrk1A tras administración de AAV-shDyrk1A en el núcleo estriado y su repercusión sobre la expresión de las subunidades del receptor NMDA

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

1. Técnicas de manipulación de bacterias

En el presente trabajo, se ha utilizado la cepa de *Escherichia coli* JM109. Para poder amplificar los distintos plásmidos de interés, se introdujeron estos mediante transformación en las células JM109 a las que se indujo previamente el estado de competencia.

1.1. Preparación de células competentes

El método utilizado para la preparación de células competentes se basa en una modificación del protocolo descrito por Chung i col. (Chung et al., 1989) que consiste en inducir el estado de competencia utilizando polietilenglicol (PEG) y dimetilsulfóxido (DMSO). Brevemente, se inoculaba una colonia aislada de JM109 en 20 ml de LB y se incubaba entre 16-20h a 37°C en agitación. A partir de este cultivo fresco se hacía una dilución 1/200 en 10 ml de LB hasta que las células alcanzaron una $D.O_{600} = 0.3-0.4$ unidades (fase de crecimiento exponencial de las bacterias). Entonces, se precipitaban las células centrifugando 5 min a $3000 \times g$ a 4°C y se resuspendían en 1ml de solución TSB dejando incubarse un mínimo de 20 min a un máximo de 2h, en hielo. En este punto, las bacterias ya estaban listas para ser transformadas.

1.2. Transformación

Para transformar las bacterias competentes con el plásmido deseado se mezclaban 2-5 μ l (25-50 ng) de DNA plasmídico con 100 μ l de la suspensión de bacterias competentes, después, se incubaba la mezcla en hielo durante 30 min. Pasado este tiempo, se añadían 400 μ l de TSB a la mezcla y se incubaba durante 45 min a 37°C en agitación. Después de una centrifugación a 16,000 $\times g$ durante 1 min, se aspiraba el sobrenadante dejando unos 50 μ l de medio para resuspender las células. Las células resuspendidas se extendían con un asa *Digralsky* sobre una placa de LB-agar precalentada a 37 °C que contenía el antibiótico de selección (ampicilina (100 mg/ml) o kanamicina (30 mg/ml)) según el plásmido con el que se estaba trabajando y, se dejaban a 37 °C, O/N. En los casos en los que interesaba conservar las bacterias transformadas se

preparaba un stock de glicerol. Para ello se inoculaba una colonia en 5 ml de LB+antibiótico y, las bacterias se incubaban a 37 °C, O/N, en agitación a 200 r.p.m. Para cada mini-cultivo se preparaba un glicerol añadiendo a un criotubo 750 µl de cultivo y 250 µl de glicerol al 80%. Tras mezclar suavemente las células con el glicerol, se congelaba la mezcla rápidamente en nieve carbónica y se guardaba a -80 °C.

Reactivos y soluciones

- **LB + antibiótico:** LB (10g triptona, 5 g/l extracto de levadura y 5 g/l NaCl) que contiene 50 mg/l de ampicilina o 30 mg/l de kanamicina.
- **Placas de LB-agar:** LB + 1.5% (p/v) agar + 50 mg/L ampicilina o bien, + 30 mg/L kanamicina.
- **TSB:** LB que contiene 10% (p/v) PEG3000, 5% (v/v) DMSO, 10 mM MgSO₄ y 10 mM MgCl₂.

2. Técnicas de obtención y manipulación del DNA

2.1 Minipreparación de DNA plasmídico

Este procedimiento tiene como objetivo la obtención de pequeñas cantidades (20-50 µg) de DNA plasmídico y se ha utilizado en los pasos intermedios de los diferentes clonajes realizados en este trabajo. A partir de una placa de un cultivo bacteriano puro, se inoculaba una colonia aislada y se hacía crecer durante toda la noche (16-20 h) en 5 ml de LB, en presencia del antibiótico para el cual el plásmido a aislar era resistente. Para el aislamiento del plásmido se utilizaba el sistema comercial *QIAprepTM Spin Miniprep kit* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. El principio en el que se basa este sistema consiste en producir una lisis alcalina del cultivo bacteriano y unir el DNA a una resina de intercambio iónico bajo condiciones de baja salinidad y pH adecuados. Las proteínas, RNA, sales e impurezas se eluyen con un lavado de salinidad media. La elución del DNA se realizaba con una solución TE (10 mM Tris- 1 mM EDTA). Una vez purificado el DNA plasmídico se procedía a su cuantificación.

Reactivos y soluciones

- *QIAprepTM Spin Miniprep kit* (QIAGEN S.A., Courtaboeuf Cedex, France cat.no: 12163)
- **LB + antibiótico:** LB (10g triptona, 5 g/l extracto de levadura y 5 g/l NaCl) que contiene 50 mg/l de ampicilina o 30 mg/l de kanamicina

2.2 Maxipreparación de DNA plasmídico

Este procedimiento se ha utilizado para obtener grandes cantidades de DNA plasmídico (100-500 µg) de gran pureza, imprescindible para la transfección de células de mamífero. Las maxipreparaciones se realizaban a partir de 200 ml de cultivo bacteriano saturado y se utilizaba el sistema comercial de QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El principio de aislamiento del DNA plasmídico de este sistema era idéntico al explicado anteriormente con las minipreparaciones.

- *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN S.A., Courtaboeuf Cedex, France cat.no: 12163)
- **LB + antibiótico:** LB (10g triptona, 5 g/l extracto de levadura y 5 g/l NaCl) que contiene 50 mg/l de ampicilina o 30 mg/l de kanamicina

2.3 Cuantificación del DNA (D.O.)

Para calcular la concentración de DNA total se medía la absorbancia o densidad óptica (D.O.) de la muestra a una longitud de onda de 260 nm, utilizando un espectrofotómetro, y aplicando la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA}] = \text{DO}_{260} \times \text{factor de dilución} \times (50 \text{ ug/ml DNA}/\text{DO}_{260}).$$

También se medía la absorbancia de las muestras a 280 nm (longitud de onda en la que se absorben las proteínas) y se aplicaba la razón D.O. 260/280 para determinar el grado de pureza (cuanto más cerca de 2.0 sea el valor, más pura será la muestra).

2.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Dicha técnica se utiliza para separar fragmentos de DNA de diferente tamaño. Las muestras de DNA se someten a un campo eléctrico y migran a través de una matriz (gel) hacia el ánodo, debido a su carga negativa neta (proporcional al tamaño). El porcentaje de agarosa del gel se escogía en función de los fragmentos que se querían aislar o analizar. Para analizar fragmentos de pequeño tamaño se utilizaba un 2% de agarosa, en cambio para fragmentos más grandes se utilizaba un 0.8% o 1%. Las muestras se preparaban junto con tampón de carga que contiene glicerol (confiere densidad suficiente para que la muestra se pueda cargar correctamente en el pocillo), azul de bromofenol y xilen cianol (que migrarán hacia al ánodo como fragmentos de 500 pb y 4 Kb respectivamente) para monitorizar la electroforesis. Paralelamente se cargaba el marcador de pesos moleculares de 1Kb de DNA (1ug/ml) para hacer una estimación del tamaño de los fragmentos de DNA. Se utilizaba la solución tamponada TBE 0.5x para preparar los geles de agarosa y correr las muestras. Así mismo se añadía a la solución de agarosa líquida, bromuro de etidio 0.5ug/ml final, que es un agente intercalante del DNA que permite su visualización en un transiluminador (*Gel Doc 1000, Biorad*) de luz ultravioleta.

Reactivos y soluciones:

- **Agarosa:** Seakem LE Agarose (Cambrex Bioscience, Rockland Inc.) cat nº: 50005.
- **Bromuro de etidio (BrEt):** 10 mg/ml en solución acuosa (Sigma cat nº E1510).

- **Marcadores de pesos moleculares:** 1Kb DNA ladder (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Gibco BRL, Life technologies); DNA Molecular Weight Marker II, 0.12-23.1 Kb (0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), (Roche Diagnostics).
- **TBE 10x:** 900 mM Tris.base; 720 mM ácido bórico; 24 mM EDTA; diluir en agua destilada (H_2O). Ajustar el pH a 8.3 con ácido acético.
- **Tampón de carga 6X azul:** 0.25% (p/v) azul de bomofenol; 0.25% (p/v) xilencianol; 60% (v/v) glicerol diluido en H_2O .

2.5 Construcción de plásmidos

Las diferentes construcciones empleadas en este trabajo se obtuvieron mediante técnicas básicas de clonaje de fragmentos de DNA. Para obtener estos, primero se digería el DNA diana mediante enzimas de restricción y a continuación se purificaba el fragmento resultante. Posteriormente se ligaba dicho fragmento (o inserto) en el plásmido correspondiente.

2.5.1 Obtención de insertos de DNA mediante la digestión con enzimas de restricción y posterior purificación de los fragmentos de DNA resultantes.

La digestión del DNA plasmídico mediante enzimas de restricción permitía liberar los insertos que habían de ser clonados en los diferentes plásmidos. Este procedimiento consistía en incubar el DNA con él/los enzima/s correspondientes a las condiciones apropiadas de la reacción.

La cantidad de DNA, concentración de sales, temperatura y duración de las digestiones dependían del enzima de restricción empleado en cada caso. Como norma general, se aplicaba la siguiente reacción:

Reactivos	Concentración
DNA	0.5 – 2 μg
Tampón de restricción 10x	1x
BSA* 10 mg/ml (100x)	0.1 mg/ml (1x)
Enzima/s de restricción 10U/ μl	1 U/ μg de DNA
H_2O d c.s.p	50-100 μl

Las reacciones se incubaban a la temperatura óptima del enzima (generalmente 37°C) durante un mínimo de 2 h. Cuando era necesario digerir un fragmento con dos enzimas con tampones de

reacción incompatibles, se realizaba, entre la primera y la segunda digestión, un paso intermedio de purificación utilizando el kit comercial *QIAquick PCR Purification Kit*. En todos los casos, los productos de la reacción se analizaban en un gel de agarosa y, en los casos necesarios, se obtenían los diferentes fragmentos para su posterior purificación.

Para llevar a cabo la purificación de los fragmentos de DNA de los geles de agarosa, se utilizó el kit comercial *Qiaquick Gel Extraction Kit*, siguiendo el protocolo especificado en las instrucciones del fabricante. Brevemente, este procedimiento se basaba en un sistema de tres pasos: primero se solubilizaba el fragmento de agarosa a 55°C, seguidamente se adsorbía el DNA en una membrana de sílice y se lavaba de las posibles impurezas del gel y, finalmente, se eluía el DNA con una solución tampón de Tris·HCl 10 Mm pH 8.5 y se guardaba a -20°C.

Reactivos y soluciones

- **Tampón de restricción y enzima de restricción:** proporcionados por cada casa comercial.
- ***BSA:** sólo se incluía en la reacción cuando el fabricante lo recomendaba.
- *QIAquick PCR Purification Kit:* Qiagen S.A., cat n° 28104
- *Qiaquick Gel Extraction Kit:* Qiagen S.A. cat n° 28704

2.5.2 Obtención de insertos de DNA mediante anillamiento de oligonucleótidos.

Para el anillamiento de oligonucleótidos (oligos) se siguió el protocolo utilizado por el laboratorio de Yang Shi (Sui et al., 2002) explicado a continuación. Primero se mezclaban en un tubo el par de oligos que queríamos anillar, a razón de 10 µl cada oligo (concentración inicial de 250 pmoles/µl) y en un volumen final de 200 µl (180 µl de H₂O). A continuación, el tubo conteniendo la mezcla se incubaba en un vaso de precipitados con agua sobre una placa calefactora, hasta llegar al punto de ebullición. Se dejaba hervir 5 min y se retiraba el vaso, dejándolo enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Por último se procedía a cuantificar la concentración de los oligos anillados (ver apartado 2.3) que debía oscilar entre los 550 y los 700 µg/ul, determinados por la absorbancia a 260nm.

2.5.3 Preparación del vector para la ligación

Los vectores se digerían con los enzimas adecuados (según protocolo descrito en apartado 2.5.1) y, cuando era necesario, se trataban con Fosfatasa Alcalina (FA) con el fin de desfosforilar los extremos y evitar la religación del vector. Se procedía según se detalla a continuación:

.

Reactivos	Concentración o Volumen
Plásmido digerido y purificado	2 µg
Tampón de la FA (10x)	1x
<i>Calf Intestine</i> FA (1U/ µl)	1U
H ₂ O c.s.p	50 µl

Las reacciones se incubaban durante 1h a 37°C y se inactivaban durante 15 min a 65°C. Finalmente, y previamente a la ligación con el inserto, los vectores digeridos y desfosforilados se purificaban con el kit comercial *QIAquick PCR purification kit*.

Reactivos y soluciones

- **FA y tampón:** Fosfatasa Alcalina, *Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, Roche Diagnostics cat n° 713023.

2.5.4 Ligación de fragmentos de DNA

Las DNA ligasas catalizan de forma ATP-dependiente la formación de puentes fosfodiéster entre un grupo 5' fosfato y un grupo 3' hidroxilo del DNA de doble cadena. Esta actividad enzimática permitía unir fragmentos de DNA digeridos previamente con enzimas de digestión que tenían extremos romos (*) o cohesivos. En este trabajo se utilizó la DNA ligasa purificada a partir del fago T4 (*Boehringer Mannheim*).

Una vez purificados, el inserto (I) y el vector (V) se ligaban siguiendo la reacción que se detalla a continuación:

Reactivos	Concentración o Volumen
Vector	50 ng
Inserto	Razón molar 3:1 * (I:V)
Tampón de la ligasa (10x)	1x
T ₄ ligasa (1U/ µl)	1U
H ₂ O c.s.p	10 µl

* Según era el caso, se probaban distintas ratios (5:1, 4:1, 3:1, 2:1) para mejorar la eficiencia de la ligación, sobre todo cuando usábamos los oligos anillados como inserto.

Se calculaba la cantidad de inserto necesaria para la ligación aplicando la fórmula siguiente:

$$\text{ng V} \times \frac{\text{Kb I}}{\text{Kb V}} \times \text{razón molar (I:V)} = \text{ng insert}$$

Las reacciones se incubaban 16-20 h a 4°C, se transformaban los productos de las ligaciones en *E. Coli* (según protocolo descrito en 1.2) y se confirmaba la presencia de los insertos mediante el uso de enzimas de restricción. En todos los pasos finales de los diferentes clonajes se confirmaba la integridad del inserto mediante la secuenciación del fragmento de interés.

NOTA: Para la clonación de los oligonucleotidos anillados en pBSU6 se utilizaba la actividad 3'-5' exonucleasa del fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I (*DNA polymerase I, Klenow fragment*; USB corporation) para obtener extremos romos a partir de cohesivos. Para una reacción de 20 µl:

Reactivos	Concentración o Volumen
Vector digerido	0.1-4 µg
dNTPS	0.5 mM
Tampón de <i>Klenow</i> 10x	1x
<i>Klenow</i>	1-5 U
H ₂ O d c.s.p	20 µl

A continuación, la mezcla se inactivaba a 75°C durante 10 min y se purificaba utilizando el *QIAquick PCR Purification Kit* (ver apartado 2.5.1).

2.6 Secuenciación de fragmentos de DNA

El método de secuenciación automática usado en este trabajo se basa en el método enzimático descrito por F. Sanger y colaboradores (Sanger et al., 1977) y consiste en sintetizar fragmentos de DNA marcados con un fluorocromo y, complementarios a la cadena molde, que se separa por electroforesis en geles de policarilamida de elevada resolución.

2.6.1 Reacción de secuencia

Para la obtención de la secuencia de fragmentos de DNA subclonados en vectores

plasmídicos, primero, se llevaba a cabo la PCR de secuencia. Se partía de 250-500 ng de DNA plasmídico. Otros componentes de la reacción eran: 1 µl de *primer* (3'2 µM), 2µl de Big-dye 3.0 (*AbiPrisa*) que contenía la DNA polimerasa y los dideoxinucleótidos marcados fluorescentemente, y por último, 6 µl de agua destilada. Las condiciones de la reacción de secuencia eran independientes del *primer* de PCR utilizado, y consistían en un primer ciclo de desnaturalización (5' a 94°C) seguido de 28 ciclos compuestos de 1 ciclo de desnaturalización (30 seg, 94°C), anillamiento (15 seg, 50°C) y extensión (4 min, 60°C).

Los cebadores utilizados para las reacciones de secuenciación eran los siguientes:

T7 (pBluescript): 5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'

T3 (pBluescriptSK): 5' TTAATTGGGAGTGATTTCCC 3'

U6 F (promotor U6 del pBSU6): 5' CCCCTCGCACAGACTTG 3'

U6 R (promotor U6 del pBSU6): 5' AGAGATGGCGGGGTCGG 3'

2.6.2 Purificación y análisis de los productos de la reacción de secuencia

Tras la reacción de secuenciación, los productos se purificaban en columnas que contenían 800 µl de Sephadex G-50 equilibrado con agua (AutoseqTM G-50, Amersham) y se centrifugaban a 1000 x g durante 1 min. Las columnas se equilibraban con 10 µl de agua, se centrifugaban y se añadían 10 µl de la reacción de secuencia, se volvía a centrifugar en las mismas condiciones y se recogían los eluidos. Finalmente se secaban las muestras en un concentrador centrífugo (*Speed-Vac*) y se congelaban a -20°C protegidas de la luz. Una vez purificadas, las reacciones de secuencia se corrían y analizaban con un secuenciador automático ABIPRISM 3100 (Applied Biosystems), en la Unidad de Secuenciación y Análisis de Fragmentos del Servicio de Genómica de la Universitat Pompeu Fabra.

Reactivos y soluciones

- **Big-Dye Terminador 3.0:** Applied Biosystems.
- **Sephadex G-50 Fine:** Amersham Bioscience Biotech.
- **Autoseq G-50 columns:** Amersham Bioscience Biotech.

2.7 Extracción de DNA genómico de ratón

A partir de una biopsia de la cola, se realizaba la digestión del tejido mediante incubación en una solución con 700 μ l de SSTE, la cual contenía detergente necesario para solubilizar membranas y disgregar así el tejido. Se dejaba O/N, a 55°C en agitación suave. Para ayudar a la disgregación se añadía Proteinasa K a una concentración final de 0.5 mg/ml. Al día siguiente se añadía Rnasa A (concentración final de 0.12 mg/ml) y se dejaba incubar durante dos horas a 37°C. La purificación del DNA se realizaba utilizando solventes orgánico en tres etapas. En la primera se añadía un volumen equivalente de fenol (equilibrado con 100 mM TrisHcl pH 8), en la segunda, un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y en la tercera, un volumen de cloroformo-isoamílico (24:1). En cada etapa, después de añadir el solvente orgánico, se dejaba incubar 15 min a T^a amb. con agitaciones esporádicas de las muestras. Después se centrifugaba a 15000 x g durante 15 min para separar las dos fases. Se recuperaba la fase superior (contenía el DNA) y se pasaba a la etapa siguiente. Después de la última centrifugación, se recuperaba el sobrenadante y se procedía a la precipitación del DNA. Para ello se añadía un volumen de isopropanol y 15 μ l de NaCl 5M. Se invertía suavemente hasta ver la medusa de DNA. Pasados 10 min se centrifugaba a 13000 x g y se decantaba el sobrenadante. Se lavaba el precipitado con etanol al 70%, se decantaba y después se dejaba evaporar a T^a amb. Para solubilizar el DNA se añadían 75 μ l de TE 10/1, se resuspendía y se dejaba incubando a 65°C durante una hora. Finalmente, para resuspender perfectamente el DNA se incubaba la muestra a 37 ° C durante toda la noche. Este protocolo permitía obtener entre 75 y 125 μ g de DNA genómico purificado.

Reactivos y soluciones

- **SSTE:** SDS 1%; 100 mM NaCl; 15 mM EDTA; 50 mM Tris-base
- **RNasa:** 10 mg/ml *Rnasa A* en Tris-HCl 10 mM (pH=7,5) y NaCl 15 mM.
- **Proteinasa K:** 10 mg/ml *proteínasa K* (Invitrogen) en H₂O MilliQ
- **Tampón TE 10/1:** 10 mM Tris-Hcl pH 7'5; 1 mM EDTA pH 8

2.8 PCR de genotipación

La genotipación de los ratones TgDyrk1A utilizados en este trabajo se realizaba mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polimerase Chain Reaction*). La PCR permite amplificar in vitro un fragmento de DNA determinado mediante la utilización de oligonucleótidos (cebadores o *primers*) que presentan una secuencia complementaria a los

extremos del fragmento que hará de molde de la reacción. Los componentes de la reacción consistían en:

Reactivos	Concentración o Volumen
DNA	200-300 ng
dNTPs	1.25mM
Tampón de la Taq polimerasa 10x	2.5 µl
Cebador DyrkF 10 mM	1 µM
Cebador DyrkR 10 mM	1 µM
Taq Polimerasa	0.5 U
H ₂ O d.c.s.p	25 µl

Las reacciones de PCR tenían lugar en un termociclador Perkin Elmer (modelos 9600 o 9700) utilizando tubos de plástico de 200 µl (AttendBio) y sus correspondientes tapones (AttendBio). Las condiciones de amplificación empleadas en este trabajo consistían en: un primer ciclo de desnaturalización de 3 min a 94°C, y de 32 ciclos consistentes en una desnaturalización de 30 seg a 94°C, 30 seg a 54°C para el anillamiento de los cebadores y 45 seg a 74°C para la polimerización del DNA. Por último, las reacciones pasaban por un ciclo de extensión final de 10 min a 74°C tras el cual se mantenían los tubos a 15°C en el mismo termociclador hasta su recogida.

Una vez acabada la reacción, se valoraba el resultado de ésta corriendo 5-10 µl de las muestras en un gel de electroforesis al 2% de agarosa (ver apartado 2.4) y visualizando los fragmentos (de 490 pb) con bromuro de etidio bajo la luz ultravioleta del transiluminador.

Reactivos y soluciones

- **dNTP's: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (1:1:1:1).** Pharmacia Biotechnology
- **Taq (*Thermus aquaticus*) DNA pol.** y tampón suplementado con 1.5 mM MgCl₂. Roche Diagnostics, cat n° 1596594.
- **Cebadores:** DyrkF: 5'- GTCCAAACTCATCAATGTATC-3'
DyrkR: 5'- CTTGAGCACAGCACTGTTG -3'

3. Técnicas de obtención y manipulación de proteínas

3.1. Obtención de proteína de extractos totales

En este trabajo se han obtenido extractos proteicos totales tanto de células en cultivo (NIH3T3, COS-7, HEK293, HEK293T, cultivos primarios de células granulares) como de tejido de ratón (diferentes áreas cerebrales: corteza cerebelar, núcleo estriado, hipocampo, córtex) siguiendo diferentes protocolos en función de la proteína que se quería detectar.

3.1.1. Obtención de extractos proteicos a partir de células de mamífero

Tras aspirar el medio de cultivo, las células se lavaban 3 veces con tampón PBS 1X frío para eliminar los posibles restos de medio de cultivo. A continuación, se añadía el volumen de tampón de lisis 1X adecuado para cada placa o pocillo (i.e. para una placa de 60 mm de diámetro, se añadían entre 100 a 150 μ l de tampón). A continuación se recogía el lisado y se transfería a un tubo eppendorf. Se hervían las muestras durante 10 min a 98°C y se centrifugaban a 16000 x g también durante 10 min. Los sobrenadantes se guardaban en nuevos tubos a -80°C hasta su cuantificación.

* Para la detección de la actividad luciferasa, el protocolo de extracción variaba. Los lavados con PBS 1x se realizaban sobre hielo. Una vez que se añadía el tampón de lisis (específico para la detección de actividad luciferasa) se dejaba la placa durante 5-10 min en agitación a 4°C y a continuación se guardaba a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

Reactivos y soluciones

- **Tampón de lisis:** Tris-HCl 25 mM, SDS 1% (p/v), EDTA 0.001 mM.
- **Tampón de lisis para luciferasa:** *ReporterLysis Buffer 5x* (de Promega Corp.)

3.1.2. Obtención de extractos proteicos a partir de tejido de ratón

Las muestras de tejido (1:10; p/v; mg/ μ l), se homogenizaban, en frío, en un tampón que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM EDTA y 320 mM de sacarosa*. En fresco, se añadían los inhibidores de proteasas (*Complete Mini, Roche;* y PMSF) a razón de una tableta de

Complete por 10 ml y de 100 µl de PMSF por ml de tampón. La homogeneización se realizaba en frío y de forma mecánica, evitando hacer espuma y se utilizaba para ello un homogeneizador de vidrio tipo-*potter* con émbolo de vidrio esmerilado. El homogenado obtenido al girar el émbolo 10-12 veces, se centrifugaba a 800 x g durante 10 min, a 4 °C. El sobrenadante se transfería a un tubo limpio y se guardaba a -80°C hasta su cuantificación.

* Cuando queríamos detectar actividad luciferasa, el protocolo de extracción variaba. Una vez que se añadía el tampón de lisis (específico para la detección de actividad luciferasa; 1:10; p/v; mg/µl), se mezclaba bien con la ayuda de un vórtex y se incubaba durante 15 min a 25°C. A continuación se centrifugaba a 16000 x g durante 5 min y se guardaba el sobrenadante a -80° hasta el momento de su utilización.

Reactivos y soluciones

- **Tampón de homogeneización:** 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM EDTA y 320 mM de Sacarosa (*Merck*).
- * **Tampón de lisis de luciferasa:** *Cell Culture Lysis Reagent* de Promega Corp.: 25 mM Tris pH 7.8, 2 mM DTT, 2 mM 1.2 ácido diaminociclohexano tetracético, 10% (p/v) glicerol, 1% (p/v) Tritón-X-100, 1.25 mg/ml lisozima y 2.5 mg/ml BSA.
- **PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo 100 µM en isopropanol. Concentración final: 10 mM.

3.2. Cuantificación de proteínas

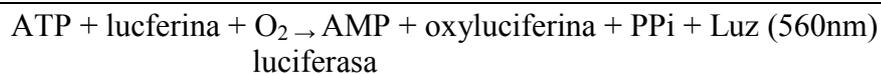
Todos los extractos proteicos se cuantificaban usando el método colorimétrico del BCA™ *Protein Detection Kit* (*Pierce*) basado en la capacidad que tiene el ácido bicinonínico (BCA) de quelar los iones de Cu^{1+} resultantes de la reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} por parte de los enlaces peptídicos de las proteínas en solución alcalina. Así, la quelación de los iones de Cu^{1+} por cada 2 moléculas de BCA favorece el viraje de la solución de verde a violeta intenso, el cual absorbe a una $\lambda=562\text{nm}$, y es proporcional a la cantidad de proteína de la muestra. Para la cuantificación se utilizaba una dilución seriada o estándar de BSA (Albúmina Sérica Bovina) que consistía en una batería de diluciones que abarcaba desde los 2 mg/ml hasta los 125 ug/ml. Se cargaba tanto 10 µl de cada una de las muestras como de cada dilución de la curva estándar en una placa de lector de ELISA y se incubaban a 37°C durante 30 min. Pasado este tiempo, se procedía a la lectura de la absorbancia a $\lambda=562\text{nm}$ mediante un lector de ELISA, modelo *Versamax Microplate Reader* (*Molecular Devices*).

Reactivos y soluciones

- **BCA Protein Assay Kit** (Pierce): reactivo A = Solución de ácido bicinconinico; reactivo B = 4% (p/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Ratio A:B (50:1).

3.3. Determinación de la actividad luciferasa

El ensayo luciferasa es un método que se basa en la propiedad del enzima luciferasa de emitir luz como subproducto de la catálisis del sustrato luciferina según la reacción siguiente (de Wet et al., 1987):



En este trabajo se ha utilizado el enzima *firefly luciferase*, codificada por el gen de la luciferasa de la luciérnaga (*Photynus pyralis*). Se ha medido la actividad luciferasa tanto a partir de extractos proteicos provenientes de cultivos celulares como de tejido (ver apartado 3.1.1 y 3.1.2).

- A partir de cultivos celulares: se descongelaban los extractos en hielo y se transferían 10 μl a una placa opaca de 96 pocillos. Se determinaba la cantidad de luz emitida por la muestra mediante el uso de un luminómetro de placa (*Orion Microplate Luminometer, Berthold*) después de añadir 30 μl del sustrato luciferina por muestra.
- A partir de tejido: se descongelaban los extractos en hielo y se transferían 10 μl de cada muestra a un tubos de poliestireno, uno por muestra. Se determinaba la cantidad de luz proveniente de cada muestra mediante el uso de un luminómetro de tubos (*Autolumat Plus LB953, Berthold*) tras inyección automática de 30 μl de luciferina.

Reactivos y soluciones

- *Luciferase Assay System*: Promega Corp. Cat n°: E4030

3.4. Análisis de proteínas mediante Western Blot

La técnica de Western Blot nos permite detectar proteínas de diferentes tamaños de manera muy específica en extractos procedentes de tejido y/o cultivos celulares. Consiste en separar las proteínas mediante una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en geles

verticales de poliacrilamida y transferirlas a una membrana de nitrocelulosa en la cual podemos detectar cada proteína mediante el uso de anticuerpos específicos.

3.4.1. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

La electroforesis es una técnica que se basa en la capacidad de las partículas con carga eléctrica en solución de migrar a diferente velocidad cuando la solución es sometida a la acción de un campo eléctrico. La electroforesis en gel de acrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) es una técnica de electroforesis en la cual las proteínas son desnaturalizadas en presencia del detergente aniónico SDS y calor, rompiendo así los enlaces disulfuro y formando un compuesto SDS-proteína que migra hacia el ánodo en función de su peso molecular. La resolución de este sistema permite diferenciar entre proteínas de diferente peso molecular.

Las electroforesis se realizaban en un equipo *Mini-Protean III Electrophoresis System (Bio Rad)* utilizando geles discontinuos de acrilamida (Ornstein, 1964) con un gel concentrador al 4% acrilamida y, un gel separador con un porcentaje de acrilamida variable (entre el 7.5% y el 8%) dependiendo de la medida de las proteínas que se quería separar. Para polimerizar la acrilamida se utilizó PSA (persulfato de amonio, Sigma) al 0,1% (p/v) y TEMED (N, N, N', N'-tetrametil-etilen-diamina, Sigma) al 0,02% (v/v) en ausencia de oxígeno.

Los extractos proteicos se diluían en tampón de carga Laemmli 6X, posteriormente se incubaban a 98 °C durante 10 min e inmediatamente se cargaban en el gel. Para estimar el tamaño de las proteínas separadas, se utilizaba una mezcla comercial de proteínas preteñidas (*BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen*).

Las muestras junto con la mezcla de proteínas utilizada como marcador de peso molecular se corrían a un voltaje fijo, a 120 mV durante aproximadamente 1h 30 min.

Reactivos y soluciones

- **Gel concentrador:** 3,9% acrilamida - 0,1% bisacrilamida en SDS al 0,1% (p/v), Tris-HCl 125 mM (pH=6,8), 0.1% (p/v) de APS y 0.2% (v/v) de TEMED.
- **Gel separador:** 7.5% (v/v) acrilamida - 0,203% (v/v) bisacrilamida en SDS al 0,1% (p/v) y Tris- HCl 375 mM (pH=8,8).
- **Solución de acrilamida-bisacrilamida:** 30% (p/v) acrilamida, 0.8% (p/v) bisacrilamida (37:5:1, *National Diagnostics*).
- **Tampón de carga Laemmli (6X):** Tris-HCl 350 mM (pH=6,8), glicerol al 30% (v/v), SDS al 10% (p/v), DTT 0,6 M, azul de bromofenol al 0,012%, en H₂O MilliQ.

- **Tampón de electroforesis (10X):** Tris-base 250 mM, Glicina 2M, SDS al 0,1% (p/v), en H₂O *MilliQ*.

3.4.2. Electrotransferencia

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas separadas se transferían mediante la acción de un campo eléctrico, a una membrana de nitrocelulosa sobre la cual se realizaba la posterior inmunodetección. La transferencia se realizaba a 400 mA durante 1h a 4°C, en un tampón que contenía 20% de metanol y que estaba en continua agitación. Para visualizar las proteínas transferidas, las membranas se teñían de forma reversible con rojo de *Ponceau* durante 1-2 min aprox. Posteriormente el exceso de colorante se eliminaba realizando lavados en H₂O.

Reactivos y soluciones

- **Sistema *Mini Trans-Blot*** (BioRad)
- **Membrana de nitrocelulosa *Hybond-C*** (Amersham Bioscience)
- **Rojo de Ponceau:** 0.1% (p/v) Ponceau S y 5% (p/v) de ácido acético (Sigma-Aldrich)
- **Tampón de transferencia:** 25 mM Tris-HCl Ph 8.3, 200 mM glicina y 20% (v/v) de metanol

3.4.3. Inmunodetección

Una vez transferidas, las proteínas se detectaban mediante la incubación con un anticuerpo específico. Esta unión se visualizaba con la ayuda de un segundo anticuerpo conjugado al enzima peroxidasa. El protocolo constaba de cuatro pasos: el bloqueo de la membrana, la incubación con el anticuerpo primario, incubación con el anticuerpo secundario y el revelado. A continuación se describe detalladamente el procedimiento utilizado.

En primer lugar se bloqueaban las posibles uniones inespecíficas del anticuerpo a la membrana sumergiéndola en solución de bloqueo durante 1-2 h a T^a amb. A continuación, se incubaba la membrana con el anticuerpo primario O/N a 4°C. Después de tres lavados con TBS-T, se incubaba la membrana con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa durante 1h a T^a amb. Se realizaban tres lavados más y se incubaba la membrana durante 1 min con el reactivo quimioluminiscente ECL, el cual contenía el sustrato luminol (diacilhidrazida cíclica) que es oxidado en condiciones alcalinas y presencia de fenol, por el enzima peroxidasa, emitiendo luz como un subproducto de la reacción. Finalmente, la luz emitida se revelaba sobre films fotográficos *Curix RP2 plus (AGFA)*. Alternativamente, la señal quimioluminiscente era

capturada directamente de la membrana con el sistema *LAS-3000 image analyzer (Fuji PhotoFilm)* y, cuantificada con el software propio del instrumento, *ImageGauge (V. 4.0)*, para el tratamiento de los datos.

Reactivos y soluciones

- **TBS:** 10 mM Tris-HCl Ph 7.5, 100 mM NaCl.
- **TBS-T:** TBS, 0.1% (v/v) Tween-20 (Sigma)
- **Solución de bloqueo:** TBS-T, 10% (p/v) leche en polvo desnatada (Central Lechera Asturiana)
- **ECL *Western Blotting Detection Reagents*** (Amersham)

Tabla de anticuerpos primarios y condiciones de hibridación utilizados en el análisis de proteínas mediante *Western blot*

Anticuerpos Primarios (*)	Procedencia	Antígeno	Origen	Dilución	Tiempo de incubación
anti-DYRK1A	Generado en el laboratorio	C-ter (144 aa) GST-DYRK1A	Conejo	1:250	O/N a 4 °C
anti-NR1	Chemicon	C-ter (rat NR1)	Conejo	1:200	O/N a 4 °C
anti-NR2A	Sigma	C-ter (aa 1253-1391)	Conejo	1:500	O/N a 4 °C
anti-NR2B	Chemicon	C-ter	Conejo	1:500	O/N a 4 °C
anti-□-NR2C	Sigma	N-ter (aa 25-130)	Conejo	1:200	O/N a 4 °C
anti-HA	Covance, BabCo	YPYDVPDYA (HA)	Ratón	1:2.000	O/N a 4 °C
anti-GFP	Invitrogen	Proteína GFP de <i>Aequorea victoria</i>	Conejo	1:2.500	O/N a 4 °C
Anti-ACTIN	Sigma	Nd**	Conejo	1:1000-1:5000	60 min T ^a amb./ O/N a 4 °C

(1) DYRK1A, *Dual-specificity tyrosine phosphorylation Regulated Kinase 1A*; NR1, NR2A, NR2B, NR2C (NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, NMDA2C: N-methyl-D-aspartic acid Receptor subunit 1, -subunit2A, -subunit2B, -subunit2C); HA, hemaglutinina; GFP, *Green fluorescent protein*.

** Nd: no disponible

Tabla de anticuerpos secundarios y condiciones de hibridación utilizados en el análisis de proteínas mediante *Western blot*

Anticuerpos secundarios (*)	Procedencia	Origen	Dilución	Tiempo de incubación
anti-Ig ratón HRP	DakoCytomation	Conejo	1:2.000	1 h a T ^a amb.
anti-Ig conejo HRP	DakoCytomation	Ratón	1:2.000	1 h a T ^a amb.

(*) Tipo de inmunoglobulina y especie en la que se ha generado. HRP, *Horse radish Peroxidase*

3.5. Inmunofluorescencias sobre células

Las inmunofluorescencias se han realizado en células COS-7 crecidas en monocapas sobre cubreobjetos (12 mm diam.). Antes de iniciar la inmunofluorescencia, los cubreobjetos se retiraban de la placa de cultivo y se lavaban tres veces en PBS 1X. A continuación, las células se fijaban durante 15 min con paraformaldehído al 4% (p/v) (PFA-4%) a T^a amb. Después de lavar las células nuevamente en PBS 1X, éstas se guardaban en el mismo tampón de lavado, a 4 °C, hasta su utilización*.

* Para evitar la contaminación de las células cuando la inmunofluorescencia se realizaba después de más de 24 h de haberlas fijado, éstas se guardaban en PBS 1X con azida sódica al 0,02% (p/v).

Las células fijadas se permeabilizaban con 100 µl de una solución PBS 1X y Tritón X-100 al 0,1% (v/v) a T^a amb. que se añadían sobre el cubreobjetos y se dejaban durante 10-15 min.

Tras la permeabilización, se realizaban un par de lavados de 5 min con PBS 1X se bloqueaban las uniones inespecíficas incubando las células durante 1h a T^a amb. con una solución de PBS1X que contenía 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado (PBS 1X-10% FBSi). A continuación, se incubaba con el anticuerpo primario (Tabla 6), diluido en PBS 1X + 1% FBSi, durante 1 hora a T^a amb. Pasada la hora, se realizaban tres lavados de 5 min cada uno con PBS1X-Tritón X-100 al 0,1% (v/v) + 1% FBSi y se incubaba con el anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo (Tabla 7) (dilución 1/100, anti-rabbit FITC, *Southern Biotechnologies*) diluido en PBS 1X + 1% FBSi, durante 1 hora, convenientemente tapado de la luz. Después, se realizaban cuatro lavados de 5 min cada uno con PBS 1X-Tritón X-100 al 0,1% (v/v) + 1% FBSi y un último lavado con PBS 1X. Después se procedía a montar los cubreobjetos utilizando un medio de montaje comercial (*Vectashield, Vector*) que contenía 0'2 µg/ml 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para la visualización de los núcleos celulares y se sellaban a unos portaobjetos con esmalte de uñas. Las preparaciones se visualizaban con un microscopio Leica DMR. Las

imágenes se capturaban con una cámara digital en color (Leica DC500, *Leica*) utilizando el software Leica IM1000 (*Leica*).

Reactivos y soluciones

- **PBS 1X:** NaCl 127 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM (pH=7,4).
- **PFA-4%:** se disuelve el paraformaldehído (Sigma) al 4% (p/v) en PBS 1X calentando la solución a 60°C con agitación suave. Se filtra y se congela en alícuotas a -20°C.
- **FBSi:** suero fetal bovino (GIBCO) inactivado en un baño de agua a 58°C durante 30 min. Se preparan alícuotas y se congelan a -20°C.
- **Azida sódica:** se prepara una disolución *stock* de ácido sódico al 20% (p/v) en PBS 1X y se almacena a 4 °C.

3.6. Inmunohistoquímica sobre secciones de tejido de ratón

La detección de proteínas en tejido mediante inmunohistoquímica se ha realizado sobre secciones coronales de cerebro. Con ayuda del atlas estereotáxico del cerebro de ratón (Franklin and Paxinos 1997) se seleccionaron las secciones correspondientes a las áreas de interés (i.e. secciones que abarcaban el núcleo estriado y el cerebelo principalmente). A continuación se describen los procedimientos utilizados para la preparación de las muestras, obtención de las secciones e inmunodetección de la proteína.

3.6.1. Preparación del tejido y obtención de las secciones de cerebro

Las secciones de cerebro utilizadas para inmunohistoquímica se obtenían de material fijado. En este caso, los ratones tanto adultos (machos, 3-6 meses) como de 14 días (P14) se anestesiaban profundamente y se perfundían intracardiácamente, inicialmente con PBS 1X durante 2-5 min para limpiar de sangre del tejido y después se fijaban con PFA-4% durante 20-30 min. El cerebro fijado se separaba con cuidado del cráneo y, seguidamente, se sumergía en PFA-4% y se dejaba a 4 °C, O/N para asegurar la completa fijación de todo el tejido. Los ratones recién nacidos (P7) no se perfundían. En este caso, los animales se sacrificaban por decapitación. Seguidamente, se separaba el cerebro del cráneo y después de varios lavados rápidos en PBS 1X, para eliminar restos de sangre, los cerebros se fijaban por inmersión en PFA-4% a 4 °C, O/N. En ambos casos después de fijar el tejido se realizaban tres lavados en PBS 1X y se mantenían también en PBS 1X, a 4°C, hasta el momento de su procesamiento.

a) Obtención de secciones de cerebro en cortes de criostato

Los cerebros fijados se sumergían en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% a 4 °C hasta que éstos dejaban de flotar en la solución (entre 24-48 h). Una vez crioprotegidos, los cerebros se congelaban cubriéndolos con nieve carbónica y se guardaban envueltos en papel de plata a -80 °C hasta su utilización. Para obtener las secciones en el criostato, en primer lugar, el tejido congelado se atemperaba durante 30-40 min a una temperatura de -21 °C. El tejido se incluía en un criopreservante, el OCT y se utilizaba un criostato *Leica CM3050S*. Se obtenían secciones coronales de 30 µm de grosor a una temperatura de corte de -20 °C. A medida que se iban obteniendo las secciones se colocaban en placas *multi-well* de 48 pocillos que contenían solución crioprotectora. Las secciones se almacenaban en solución crioprotectora a -20 °C hasta la utilización de las mismas.

Reactivos y soluciones

- **Solución crioprotectora:** se diluye glicerol al 30% (v/v) y etilenglicol al 30% (v/v) en PBS 1X.
- **Solución sacarosa:** se disuelve sacarosa al 30% (p/v) en PBS 1X.
- **OCT:** (*Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound*).

b) Obtención de secciones de cerebro en cortes de microtomo

Para obtener cortes finos de cerebro en el microtomo, el cerebro fijado se incluía en parafina. Para ello, el tejido se deshidratava sumergiéndolo secuencialmente en soluciones crecientes de EtOH; 3 h en EtOH 70%; O/N en EtOH 96%; 2 lavados de 2 h, el primero, y de 1h, el segundo, en EtOH absoluto (100%). Finalmente se dejaba en Xilol durante 30 min-1h hasta que el tejido adquiriese la dureza adecuada y se procedía entonces a la inclusión en parafina. El tejido se sumergía en parafina reciclada fundida a 60-62 °C, O/N y la inclusión del tejido finalizaba dejando el tejido sumergido un mínimo de 2h en parafina nueva a 60-62 °C, hasta el momento de hacer los bloques. Para deshidratar e incluir el cerebro en parafina se utilizaban casetes de inclusión de plástico técnico de alta calidad (POM) (*Paul Marienfeld GmbH Co.*). Para hacer los bloques se utilizaba un aparato Leica EG 1120 que contiene un dosificador que permite rellenar los bloques de parafina líquida y además, una placa que puede calentarse a 60°C y que sirve para evitar que la parafina de dentro del bloque pueda solidificarse. Una vez hechos los bloques, se dejaban enfriar a T^a amb. entre 16-24 h. Finalmente, se desmontaba el bloque del molde metálico y, éste se conservaba a 4 °C hasta su utilización.

Antes de proceder a la obtención de las secciones en el micrótopo de rotación manual (*LeicaRM2135*), se enfriaban los bloques en una placa fría, 0 °C, para evitar la dilatación del

tejido. Las secciones, de 5 µm de espesor, se iban depositando, con ayuda de un pincel, en un baño de agua a 42 °C para conseguir la máxima extensión del tejido. Una vez bien extendidas sobre el agua, las secciones se recogían sobre portaobjetos tratados con poli-lisina al 10 % (v/v) y, se dejaban secar a T^a amb. durante 15-30 min y después a 37 °C durante 3-4 h. Las preparaciones se almacenaban a 4 °C hasta su utilización.

Reactivos y soluciones

- **Poly-L-lisina:** solución preparada al 10% (v/v) en H₂O_d. Se sumergen los portaobjetos en la solución durante 10 min con la finalidad de aumentar la adherencia de los cortes histológicos .

3.6.2. Tinciones histológicas

a) Tinción con hematoxilina

Este tipo de tinción se ha utilizado para poder visualizar los núcleos de las células y se ha realizado sobre cortes histológicos de 5 µm de grosor obtenidos con el microtomo. La contratinción se realizaba después del revelado con tetracloruro diaminobenzidina (DAB), sumergiendo las preparaciones en solución de hematoxilina durante no más de 30 seg. Después se eliminaba el exceso de colorante con 2-4 lavados con H₂O_d, y seguido, se sumergía el tejido en alcohol 70% y se procedía a la deshidratación de los tejidos sumergiéndolos en soluciones crecientes de etanol (70% hasta 100%) hasta acabar en el xilol. Finalmente se montaban las muestras con el medio de montaje hidrofóbico DPX y, se dejaban secar a T^a amb., O/N bajo una campana extractora de gases.

b) Tinción con violeta de cresilo

La tinción de violeta de cresilo se ha utilizado para comprobar que la morfología del tejido en las secciones obtenidas para inmunohistoquímica estaba bien preservada. El violeta de cresilo es un colorante acidófilo que tiñe específicamente el núcleo celular y el retículo endoplasmático rugoso. Las secciones en parafina almacenadas a 4 °C se sumergían en Xilol (2 veces, 5 min) y se rehidrataba el tejido dejando en soluciones decrecientes de Etanol (100%, 96% y 70%) (2 veces, 5 min en cada una). Finalmente, las secciones se lavaban con H₂O destilada y se teñían sumergiéndolas en la solución de violeta de cresilo durante 2 min. Las preparaciones de lavaban en H₂O_d y se deshidataban sumergiéndolas esta vez en soluciones con concentraciones crecientes de Etanol (70%, 96% y 100%) y en Xilol (2 veces, 5 min en cada una). Las

preparaciones se montaban con medio de montaje DPX y se dejaron secar a T^a amb., O/N bajo una campana extractora de gases.

Reactivos y soluciones

- **Hematoxilina:** Diluir la hematoxilina de Mayer (Merck) 1/5 (v/v) en H₂O MilliQ. La solución se almacena en una botella de cristal envuelta en papel de plata para evitar el contacto con la luz. La solución se filtra en el momento de su utilización.
- **Cresil violeta:** disolver el violeta de cresilo al 0.1% (p/v) en H₂O MilliQ. La solución se almacena en una botella de cristal envuelta con papel de plata para evitar el contacto con la luz.
- **DPX:** Fluka cat n°44581

3.6.3. Inmunohistoquímica sobre secciones de cerebro en flotación

La inmunohistoquímica en cortes gruesos (de 30 μm) obtenidos en el criostato se ha llevado a cabo en los pocillos de placas multi-well (de 48 pocillos) siguiendo el procedimiento que se describe detalladamente a continuación. Las secciones guardadas a -20 °C en solución crioprotectora se dejaban a T^a amb. durante 10-15 min. Seguidamente, se realizaban tres lavados de 5 min cada uno en PBS 1X + 0.3% (v/v) Tritón 100X + 5% (v/v) FBS y en agitación suave para eliminar los restos de solución crioprotectora. A continuación, se bloqueaban las uniones inespecíficas incubando las secciones en solución de bloqueo durante 1 hora a T^a amb. Después se procedía a la incubación con el anticuerpo primario diluido también en solución de bloqueo, a 4°C O/N, en agitación. A continuación se realizaban tres lavados de 30 min cada uno y se incubaba con el/los anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos (ver Tabla 8) durante 1-2h a T^a amb. en agitación. A partir de este punto, se tenía especial cuidado en proteger la placa de la luz en todas las incubaciones o lavados. Se realizaban dos lavados de 10 min cada uno y después se incubaba con el colorante nuclear *Hoestch* durante 15 min en agitación. Posteriormente se realizaban dos lavados de 10 min cada uno con PBS1X. Pasado este tiempo y con ayuda de un pincel se procedía al montaje de las muestras en los portaobjetos impidiendo en todo momento que se secasen las secciones. El montaje se realizaba en medio Vectashield (Vector Labs). Las preparaciones se visualizaban en un microscopio Zeiss (Axio Observer /Z1) con los filtros apropiados*. Las imágenes se capturaban con una cámara digital modelo AxioCamMRm (Zeiss) acoplada al microscopio y se analizaban con el software Axiovision Release 4.6.3.

* Filtro 38HE (Ex: BP470/40; BS: FT495; Em: BP525/50) para la detección de Alexa Fluor 488; FITC y la proteína GFP; 43HE (Ex: BP550/25; BS: FT570; Em: BP605/70) para la detección de

Alexa Fluor 555; Texas red y, el filtro 49 (Ex: BP365; BS: FT395; Em: BP445/50) para la detección de DAPI; y el filtro 24 (Ex: BP: 485/20 + 578/14; BS: DFT 500+600 Em: BP515-540 + P610) para la detección simultánea de Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 555.

Reactivos y soluciones

- **Solución de bloqueo:** PBS1X , 0.3% (v/v) Tritón 100X, 5% FBS (v/v).
- **Solución de lavado:** igual que la solución de bloqueo
- **Tinción nuclear:** Hoestch 33258 (bisbenzimidazole 3'-3', Sigma), diluido 1:2000 en PBS1X

3.6.4. Inmunohistoquímica sobre secciones de parafina

Antes de proceder con la inmunohistoquímica, las secciones en parafina se desparafinaban e hidrataban tal como se ha descrito para la tinción de cresil violeta (apartado 3.5.2.2. (b)). A continuación se realizaban dos lavados de 5 min cada uno en PBS 1X con agitación suave. Seguidamente se inhibían las peroxidases endógenas, esta vez incubando las secciones en una solución de PBS 1X con H₂O₂ al 3 % (v/v) y con metanol al 10% durante 20 min T^a amb y en agitación. Después de dos lavados de 5 min en H₂O se dejaban los portaobjetos a 37 °C durante 15 min para que se atemperasen. Entonces, se añadía la solución de pepsina que ayudaría a digerir la matriz extracelular para una mejor exposición antigénica de la muestra. Se dejaban las muestras 10 min a 37°C. A continuación, se realizaba un lavado con PBS 1X durante 5 min y dos lavados de 5 min cada uno con PBS 1X-0.2%Tritón (v/v) 100X. Una vez hechos los lavados, se incubaban las muestras con una solución de bloqueo de uniones inespecíficas durante 1h a T^a amb. y se procedía a incubar con el anticuerpo primario (ver Tabla 8) O/N a 4°C. Al día siguiente, después de lavar las secciones tres veces en PBS 1X-0,2% Tritón X-100, con agitación suave durante 5 min, se utilizaba, para la inmunodetección, el sistema de estreptavidina-biotina del kit *LSAB®+SystemHRP* (Dako, ref K0679) que permitía una mayor amplificación de la señal. Este sistema se utilizaba según las instrucciones del fabricante y consistía en incubar las preparaciones durante 10 min con una primera solución (*LINK solution*) que contenía una mezcla de anticuerpos secundarios conjugados a biotina seguido de una segunda solución durante 10 min, que contenía proteínas de estreptavidina, que se unirían a la biotina, conjugadas al enzima peroxidasa. Por último, se incubaba con un sustrato cromogénico para la peroxidasa como es DAB+ (diaminobenzidina), el cual tras su oxidación por la peroxidasa permitía detectar la señal en forma un precipitado marrón. Alternativamente a esta solución C se podía preparar una solución filtrada de 0.3% (v/v) DAB y 0.01 % (v/v) H₂O₂ en PBS 1X. Se incubaban las preparaciones en una de estas dos soluciones hasta un máximo de 15 min *. Finalmente las

preparaciones se contrateñían con hematoxilina, se deshidrataban y se montaban tal como se ha descrito en apartados anteriores. Las secciones se visualizaban en un microscopio Leica DMR y la adquisición de las imágenes se realizaba con una cámara digital Leica DC500 acoplada al microscopio utilizando el software IM1000 de Leica.

- El tiempo de la reacción de revelado se controlaba visualizando en un microscopio la aparición de color en las preparaciones.

Reactivos y soluciones

- **Solución de bloqueo:** PBS1X, 3% (v/v) H₂O, 10% (v/v) metanol.
- **Solución de digestión con pepsina:** 50 ml HCl 0.2N (v/v) disuelto en H₂O, 50 mg de pepsina.
- **Solución de bloqueo de uniones inespecíficas:** PBS1X, disolver en caliente la gelatina 0.25% (*Sigma*) (p/v), una vez enfriada la solución añadir TritónX100 0.2% (v/v) y 10 % FBS.
- **Solución de DAB (diaminobenzidina):** si no se utiliza el DAB+ del kit de *Dako*, disolver DAB a una concentración de 30 mg/ml en H₂O *MilliQ*. Preparar alícuotas de 1ml y congelarlas a -20 °C.

Tabla de anticuerpos primarios y condiciones de hibridación utilizados en inmunohistoquímica.

Anticuerpos primarios	Procedencia	Epítipo/ Antígeno	Especie	Dilución	Tiempo de incubación
Anti-NR2A	Sigma	C-ter (aa 1253-1391)	Conejo	1:50	O/N a 4 °C
Anti-NR2B	Chemicon	C-ter	Conejo	1:50	O/N a 4 °C
Anti-NR2C	Sigma	N-ter (aa 25-130)	Conejo	1:50	O/N a 4 °C
Anti-NR1	Chemicon	C-ter (rat NR1)	Conejo	1:50	O/N a 4 °C
Anti-Luciferase	Sigma	Nd*	Conejo	1:400	O/N a 4 °C

- Nd: no disponible

Tabla de anticuerpos secundarios y dilución de trabajo en inmunohistoquímica

Anticuerpos secundarios	Procedencia	Especie	Dilución
Anti-cabra/anti-ratón/anti-conejo (biotinilados)	DAKO LSAB+2 K0679 Solución A (LINK)	No disponible	Nd*

- Nd: no disponible

4. Cultivos celulares y técnicas relacionadas

A continuación se describen las características y los medios de cultivo utilizados para las distintas líneas celulares con las que se ha trabajado.

- ✓ COS-7 (línea derivada de fibroblastos de riñón del mono verde africano): medio completo de cultivo: DMEM + 10% FBS *
- ✓ NIH3T3 (línea derivada de fibroblastos embrionarios de ratón): medio completo de cultivo: DMEM + 10% FBS*
- ✓ HEK293 (línea celular derivada de tejido epitelial de riñón embrionario humano): medio completo de cultivo: DMEM + 10% FBS*
- ✓ CGN (*Cerebellar Granular Neurons*, cultivos primarios establecidos a partir de neuronas procedentes de la corteza cerebelar de ratón): medio completo de cultivo para neuronas** suplementado con medio neurobasal ***

Todas ellas se mantuvieron en incubador, en atmósfera húmeda (70-80%), a 5% de CO₂ y 37°C.

- * **Medio completo de cultivo:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, *Gibco BRL*) que contiene L-glucosa (4500 mg/ml), L-glutamina y piruvato sódico, y se complementaba con 10%FBS (*Gibco BRL*), antibióticos (100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina, *Gibco BRL*) y 2mM de L-glutamina (*Gibco BRL*).
- ** **Medio completo de cultivo para neuronas:** DMEM con GlutaMAX™(*Gibco*, *Invitrogen* 21885-025).
- *** **Medio Neurobasal:** medio *Neurobasal*™ (*GibcoBRL*); *Supplement B27* 1x (*GibcoBRL*); *Glutamax* 1X (*GibcoBRL*); 20 Mm KCl; 20 Mm D-Glucosa, antibióticos (100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina, *Gibco BRL*).

4.1. Cultivos primarios de células granulares de cerebelo

El establecimiento de cultivos primarios neuronales permite el estudio in vitro de procesos celulares básicos de la fisiología neuronal. Los cultivos de células granulares de cerebelo (CGN, del inglés *Cerebellar Granular Neurons*) pueden establecerse a partir de cerebelos de ratones en edad postnatal (entre PD4 y PD8). En este estadio, las células granulares del cerebelo (mayoritarias en la corteza cerebelar) se están desarrollando activamente y padecen procesos activos de proliferación y de diferenciación. Estas neuronas se originan a partir de la capa

externa del cerebelo donde se establecerán, se diferenciarán y formarán la capa granular interna del cerebelo.

En este trabajo se han establecido cultivos tanto de ratones control de la cepa B6SJL como de ratones TgDyrk1A en homocigosis.

4.1.1. Disección y establecimiento de cultivos primarios de células granulares del cerebelo

En este trabajo se han establecido cultivos primarios enriquecidos en CGN, provenientes de ratones PD7, adaptando el protocolo descrito por Fujita y colaboradores (Fujita et al., 1999). Una vez sacrificado el ratón, se diseccionaba el cerebro con ayuda de material estéril irradiado. Se aislaba la corteza cerebelar y se ponía en placa con solución salina fría (S1, 4°C). Bajo lupa y con ayuda de unas pinzas se retiraban las meninges y los plexos coroideos para tener un mayor enriquecimiento de células granulares en el cultivo. Una vez que teníamos aislada la corteza cerebelar, se homogeneizaba mecánicamente el tejido con la ayuda de un bisturí, siempre manteniendo la esterilidad. Se llevaba la solución a un volumen de 10 ml con la solución S1 y se centrifugaba a 1500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se decantaba el sobrenadante y se resuspendía el pellet en 10 ml de solución S2 precalentada a 37°C y que contenía tripsina (a una concentración final de 0'128 mg/ml) para una completa disociación del tejido. Se incubaba en un falcon de 50 ml 37°C agitando suavemente durante 8 min. Una vez disgregado el tejido, se inactivaba la tripsina añadiendo 10 ml de solución S4 que contenía inhibidor de tripsina, DNasaI y MgSO₄ en solución salina. Se resuspendía suavemente con la ayuda de una pipeta pasteur de plástico realizando un suave movimiento arriba y abajo unas 20 veces. Posteriormente se transfería la muestra a un tubo y se centrifugaba a 1500 rpm durante 5 min. Seguido, se descarta el sobrenadante y se lavan las células con 2ml de solución S3 y 3'5 ml de solución S5, resuspendiendo arriba y abajo las células unas 20 veces. Se centrifugaba de nuevo la muestra a 1500 rpm durante 5 min, se descartaba el sobrenadante y se resuspendía el precipitado en 10 ml de solución S5. Para eliminar los restos de tejido que no se habían disgregado, se filtraba la muestra a través de un filtro estéril de poliestireno con una malla de 100µM. Después de ser filtrada, la muestra se centrifugaba a 1500 rpm durante 5 min, se descartaba el sobrenadante y se resuspendía en 10 ml de medio de cultivo DMEM-HP (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Potassium*) suplementado con un 10% de FBS (aún siendo la concentración extracelular de K⁺ de 5 mM en condiciones fisiológicas, in vitro ha de suplementarse el DMEM con potasio hasta una concentración de 25 mM con el fin de que los cultivos de células granulares sean viables).

4.1.2. Siembra y condiciones de cultivo

El recuento del número de células aisladas era un paso crítico ya que la siembra de una baja densidad celular por pocillo conducía a una muerte del cultivo mientras que una densidad demasiado elevada podía, por un lado, empobrecer rápidamente los nutrientes del medio y por otro, dificultar el análisis morfológico. Por esta razón, los recuentos celulares se realizaron por duplicado y de forma independiente a partir de dos diluciones (1:5, 1:10) de las células resuspendidas (20 μ l de células en 80 μ l de medio y 10 μ l de células en 90 μ l de medio respectivamente). En las condiciones de cultivo en que se trabajó, se determinó que la densidad de siembra óptima era de $3 \cdot 10^5$ células por cm^2 de superficie. Así, se sembraban $4.5 \cdot 10^5$ células por pocillo en placa de 24 pocillos, con 800 μ l de medio, y $7.5 \cdot 10^4$ células por pocillo en placa de 96 pocillos, con 160 μ l de medio. Las placas habían sido previamente poli-L-lisinadas (0.1mg/ml) durante 2 horas a 37°C, lavando posteriormente las placas dos veces con H₂O. Este paso era indispensable para permitir la adherencia de las células no transformadas al soporte de plástico. Las células ya sembradas se dejaban en el incubador a 37°C, con el CO₂ al 5%. Al día siguiente (DIV1) se añadía el antimicótico Ara-C (citosina arabinofuranósido, *Sigma*) a una concentración final de 10 μ M, para prevenir la proliferación de las células gliales (se estima que hay un 5-10% de células gliales por un 90-95% de neuronas) y así obtener un cultivo aún más enriquecido en células granulares. El Ara-C se aplicó a las 20 h de haber establecido el cultivo, al tiempo que se suplementaba el medio con un volumen de medio NeurobasalTM, un medio óptimo para promover el crecimiento de las neuronas en cultivo. El mantenimiento del cultivo a largo término requería cambios de medio cada 8 días, renovando $\frac{1}{4}$ del volumen del pocillo con medio NeurobasalTM fresco.

Reactivos y soluciones

- **Krebs 10x:** 1'209M NaCl; 48'3 mM KCl; 12'2 mM KH₂PO₄; 255mM Na(HCO₃)₂; 130 mM D-Glucosa. Disolver en agua y esterilizar con filtro de 22 μ m (*Millex*).
- **Solución S1:** Krebs 10x; 1'2 mM MgSO₄(H₂O)₇; Disolver en agua milliQ y ajustar el pH a 7'4 con HCl; añadir BSA (albúmina de suero bovino) a una concentración final de 3g/l y esterilizar con filtro de 22 μ m.
- **Solución S2:** tripsina (*Sigma*) a 0'128 mg/ml en 10 ml de S1. Esterilizar con filtro de 22 μ m.
- **Solución S3:** inhibidor de tripsina (*Sigma*) a 0'77 mg/ml; Dnasa I (*Sigma*) a 0'08 mg/ml; 1'5 mM MgSO₄(H₂O)₇; Ajustar el volumen a 12'5 ml con solución S1 y esterilizar con filtro de 22 μ m.

- **Solución S4:** añadir 3 volúmenes de S1 (9ml) por dos volúmenes de S3 (6ml)
- **Solución S5:** 1'2 mM MgSO₄ (H₂O)₇; 0'22 mM CaCl₂; Ajustar el volumen a 20 ml con solución S1 y esterilizar con filtro de 22 µm.
- **Medio completo:** DMEM con GlutaMAX™(Gibco, Invitrogen 21885-025).
- **Medio Neurobasal:** medio *Neurobasal*TM (GibcoBRL); *Supplement B27 1x* (GibcoBRL); *Glutamax 1X* (GibcoBRL); 20 Mm KCl; 20 Mm D-Glucosa, antibióticos (100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, *Gibco BRL*).
- **Solución de poli-L-lisina:** Poli-L-lisina (Sigma) a 10 mg/ml, en agua *Milli-Q* y guardar a -20°C. Diluir con agua a una concentración de 0.1 mg/ml y esterilizar con filtro de 22 µm.
- **Antimitótico Ara-C:** citosina arabinofuranósido (*Sigma*). Concentración final de 10 µM.

4.2. Transfecciones

La transfección de DNA a células de mamífero es una técnica ampliamente empleada para introducir DNA de manera transitoria o estable en las células. En este trabajo se han transfectado células de mamífero de manera transitoria mediante el uso de polímeros catiónicos de polo-amidoaminas. Estos polímeros, también denominados dendrímeros, permiten el ensamblaje del DNA en estructuras más compactas optimizando así su entrada a la célula (Tang et al., 1996). Se ha utilizado el sistema de dendrímeros comercial *Superfect Transfection Reagent* siguiendo el protocolo detallado a continuación.

En primer lugar, 24h antes de la transfección, se plaqueaban las células (2x10⁵ células COS-7 o 1x10⁶ células HEK293T) en placas de 60 mm de diámetro, bien directamente sobre la placa (cuando el fin era obtener extractos proteicos), bien sobre cubreobjetos estériles de 12mm (cuando el fin era realizar inmunofluorescencias). A continuación, se diluía el DNA a transfectar y el reactivo de transfección en medio de cultivo (sin FBS ni antibióticos) siguiendo una relación de 1µg de DNA por cada 6 µl de reactivo de transfección y por cada 20 µl de medio. Esta mezcla se incubaba durante 10 min a T^a amb. y en paralelo, se realizaba un lavado de las células con PBS1X. Pasados los 10 min, se añadía 1 ml de medio completo (con FBS y antibióticos) y después de mezclar bien, se transfería el volumen total a la placa con células. Después de 2-3h de incubación a 37° C, se realizaban 3-4 lavados con PBS1X y se añadía, por último, medio fresco (medio DMEM al 10% FBS) y se mantenían las células a 37°C, 5% CO₂ y 70-80% de humedad relativa hasta el momento del procesamiento de las células (ver apartados 3.4.2 y 3.5.1.)

Reactivos y soluciones

- **Reactivo de transfección:** *Superfect Transfection Reagent* (Qiagen, S.A. cat n°: 301305).

4.3. Transducción de células con vectores virales adenoasociados (AAV)

En este trabajo se han empleado dos virus adenoasociados de serotipo 2 diferentes, el virus AAV-shDyrk1A y un segundo virus, el AAV-scDyrk1A. Ambos vectores que contienen las distintas construcciones generadas en este trabajo han sido producidos en la Unidad de Producción de Vectores Virales del CBATEG (Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica de la Universitat Autònoma de Barcelona). Brevemente el proceso de generación de los virus consiste en un primer paso de cotransfección sobre células HEK293 (células empaquetadoras) del genoma viral el cual está prácticamente deletado y sustituido por la información genética de interés (nuestros constructos) junto con un segundo plásmido que contiene los genes virales Rep y Cap (necesarios para la replicación y encapsidación de los viriones producidos); en un segundo paso se realiza la coinfección con un virus helper (Adenovirus o Herpes Simplex Virus generalmente) necesario para la lisis de las células empaquetadoras y posterior liberación de los viriones; y, por último se procede a la purificación del virus producido que, en este caso, se realizó mediante ultracentrifugación por gradiente de iodixanol y posterior filtrado a través de membrana *Amicon* de 100 KDa (Amicon Ultra 100KDa). El medio de suspensión final contenía PBS1X + 1mM MgCl₂ + 2.5 mM KCl. En este punto, el stock viral resultante estaba listo para su titulación.

De este modo se han obtenido los distintos stocks virales utilizados en este trabajo. Todos ellos se alicuotaban en volúmenes de 8µl y guardados a -80°C hasta su utilización. Los títulos (genomas virales/ml) de cada uno de ellos se citan a continuación:

Títulos (vg/ml) de los diferentes stocks virales (AAVs) utilizados en este trabajo.

Virus. Stock viral	Título (genomas virales/ml)
AAV-shDyrk1A. 1° Stock	1.23 x 10 ¹² vg/ml
AAV-shDyrk1A. 2° Stock	5.21 x 10 ¹¹ vg/ml
AAV-scDyrk1A. 1° Stock	5.6 x 10 ¹¹ vg/ml
AAV-scDyrk1A. 2° Stock	5.25 x 10 ¹¹ vg/ml

4.3.1. Transducción de células HEK293

El día antes de la infección, se plaqueaban las células HEK293 que iban a ser transducidas. La cantidad dependía del experimento a realizar; para el análisis sólo de la actividad luciferasa se utilizaban placas de 96 pocillos por lo que, en este caso, se sembraban 1×10^3 células por pocillo en 150 μ l de medio completo (ver apartado 4.1. *reactivos y soluciones*). Para el análisis de Western Blot se utilizaban placas de 12 pocillos, y en este caso, se sembraban 1×10^4 células por pocillo en 1.2 ml de medio completo. El día de la infección se calculaba la cantidad de virus necesaria para cada una de las dosis infectivas previstas para cada experimento.

$$1 \text{ MOI (} \underline{M} \text{ultiplicity of } \underline{i} \text{nfec} \text{tion)} = 1 \text{ virus infectivo}^* / 1 \text{ célula}$$

* en el presente trabajo se ha asumido la regla en la cual 1 de cada 100 vg (genomas virales) es infectivo.

Una vez calculada la cantidad de virus necesaria, se procedía a la infección de las células añadiendo el virus directamente a cada uno de los pocillos y se mantenían las células en el incubador. Las diluciones a partir de los distintos stocks virales se realizaban en PBS1X.

Una vez transcurridas 24 horas, se retiraba prácticamente todo el medio de infección teniendo cuidado de no dejar totalmente secas las células y se añadía nuevo medio completo. A partir de este punto, se mantenían las células en el incubador hasta su procesamiento (4 o 6 días dependiendo del experimento).

4.3.2. Transducción de cultivos primarios neuronales

El protocolo de transducción de cultivos primarios neuronales era similar al descrito para las células HEK293 pero existían ciertas diferencias que se detallan a continuación.

El número de células que se plaqueaban en el momento del establecimiento del cultivo primario (ver apartado 4.3.) eran de 1.25×10^5 neuronas por pocillo (placa de 96), 4.5×10^5 neuronas por pocillo (placa de 24) y 9×10^5 neuronas por pocillo (placa de 12). Las neuronas se infectaban 24 horas después de establecerse el cultivo, a DIV1 (*Day In Vitro 1*). Se observó que la supervivencia neuronal 1 día después de establecer el cultivo (DIV1) era de un 70% por lo que se tuvo en cuenta este dato para el cálculo de las dosis infectivas

El tiempo de infección era de 6 hora. Pasado este tiempo, se retiraba prácticamente todo el medio de infección y se reemplazaba por nuevo medio completo suplementado con 1/5 de medio NeurobasalTM + AraC (ver apartado 4.3.).

4.4. Tratamientos celulares.

En este trabajo se han realizado experimentos de excitotoxicidad sobre CGNs, utilizándose para ello glutamato y un antagonista de los receptores NMDA de glutamato: el MK-801. Se preparaban como se describe a continuación :

- ✓ Glutamato (ácido L-glutámico): PM: 147.13 g/mol/L

Se preparaba una solución stock Glu 100 mM diluyendo 73.5 mg en 5 ml de NaOH 1M. A partir de ésta, se equilibraba el pH de la solución mezclando 50 µl de Glu 100 mM con 12 µl HCl 3N y resultando en una solución Glu 80 mM. A partir de esta solución de trabajo se realizaban las diluciones a Glu 10 mM y Glu 1.5 mM en PBS1X.

- ✓ MK-801 (dizocilpina): PM: 337.37 g/mol/L

Se preparaba una solución stock MK-801 10 mM, diluyendo 3.37 mg en 1 ml de H₂O.

- **Glutamato:** L-Glutamic acid (Tocris Bioscience, ref 0218)
- **MK801:** (+)- MK 801 maleate (Tocris Bioscience, ref 0924)

4.5. Medición de la actividad metabólica: ensayo MTT.

La medición de la actividad metabólica celular mediante la determinación de la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales es indicativa del estado metabólico y, por tanto, de la supervivencia celular. La metabolización de la sal de tetrazol (MTT, de color amarillo) [3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol bromur] convierte este sustrato en cristales de formazan solubles en DMSO, de color azulado. La intensidad de la coloración azulada se cuantificaba mediante la ayuda de un lector de placa ELISA, a una longitud de onda de 550 nm y era indicativa de la actividad metabólica celular. Esta propiedad convierte este ensayo en una herramienta muy valiosa a la hora de determinar los efectos citotóxicos de diversos fármacos. En efecto, la facilidad del análisis permite realizar un elevado número de réplicas por cada condición experimental. De forma breve, la medida de la actividad MTT se realizaba administrando 10 µl de la solución de MTT (*MTT kit I; Boehringer Mannheim*) a una concentración final de 0.5 µg/µl, en un volumen de 100 µl de medio (en pocillos de placas de 96). Se dejaba incubando a 37°C, monitorizando la reacción cada 5 min con la ayuda de un microscopio invertido. Este seguimiento permitía parar la reacción cuando comenzaban a

formarse los primeros precipitados insolubles, mediante la adición de 100 µl de DMSO para parar la reacción. Posteriormente se resuspendían las células lisadas con el fin de tener una coloración azulada homogénea, y se transferían 100 µl de cada pocillo a una placa de ELISA. La lectura de la absorbancia se realizaba en el lector de ELISA a una longitud de onda de 570 nm. Los resultados se referían, en cada cultivo, en forma de porcentaje respecto a las condiciones control (tratadas sólo con el diluyente) del propio cultivo.

Reactivos y soluciones

- **Glutamato:** L-Glutamic acid (Tocris Bioscience, ref 0218)
- **MK801:** (+)- MK 801 maleate (Tocris Bioscience, ref 0924)
- **MTT:** bromuro de 3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium (USB Corporation)
- **DMSO:** Dimetil sulfóxido (Sigma)

5. Métodos relacionados con la manipulación de animales

5.1. Modelo TgDyrk1A

El modelo murino experimental sobre el que hemos trabajado es el ratón transgénico TgDyrk1A, que sobreexpresa el cDNA de Dyrk1A de rata bajo el control del promotor de la metalotioneína del cordero (Smt-Ia) (Altafaj et al., 2001). Los animales empleados en este trabajo han sido obtenidos mediante cruces entre hembras B6SJL de genotipo salvaje (*Charles River*) y machos transgénicos heterocigotos, de la línea 33 (Altafaj et al., 2001), que presentan el mismo fondo genético. Los ratones control en todos los experimentos realizados han sido hermanos de camada que no presentaban el transgén.

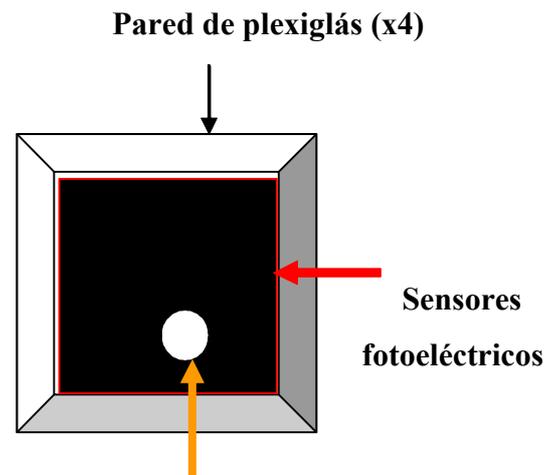
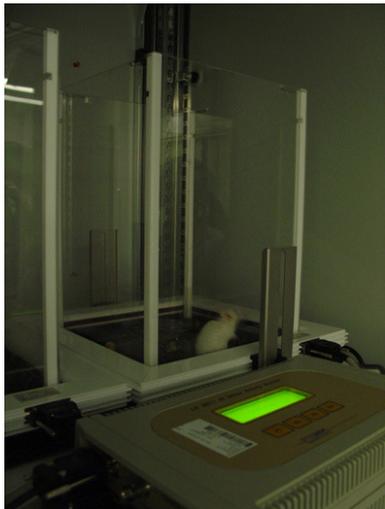
Para el mantenimiento de los animales, en el momento del destete, estos eran separados en función del sexo y los hermanos de camada se estabulaban compartiendo la misma jaula en grupos de un máximo de 5 animales por jaula. Las colonias de animales eran mantenidas inicialmente en el estabulario del Institut Municipal de Investigacions Mèdiques (IMIM) y posteriormente, trasladadas y mantenidas en el estabulario del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB). En ambos casos, las condiciones ambientales de estabulación referentes a la humedad (45-70%) y temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) eran las recomendadas por FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) y el ciclo de luz/oscuridad era de 12h (07:00-19:00, en el IMIM; 08:00-20h00 en el PRBB).

Los experimentos de este trabajo se han realizado siguiendo los procedimientos aprobados por el correspondiente Comité de Experimentación Animal (CEEA) del centro, 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.

5.2. Pruebas conductuales

Las pruebas conductuales se han realizado exclusivamente en ratones machos a distintos tiempos a lo largo de la vida de los animales. Las pruebas se realizaban en un laboratorio separado de la zona de estabulación y se tenía especial cuidado en reducir el nivel de estrés del animal durante la experimentación, lo que se conseguía además de manteniendo estables las condiciones ambientales (nivel de luz, nivel basal de ruido, temperatura y humedad), habituándolos al manejo por parte del experimentador. Para ello, durante al menos 4-6 días antes de la realización de la primera prueba, cada animal era manipulado durante 3 min exhaustivamente.

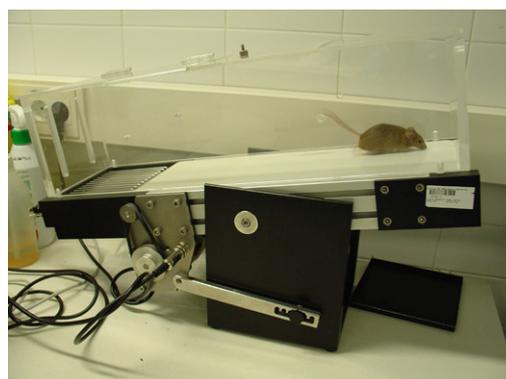
5.2.1. Actimetría



Ratón

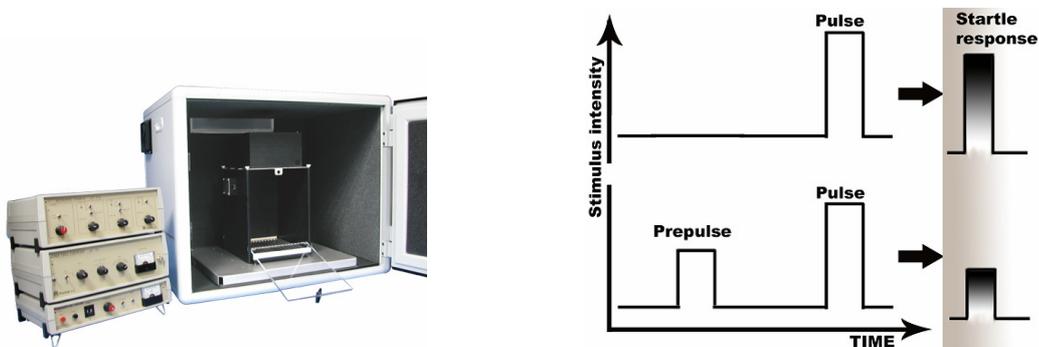
El test de actimetría permite estudiar la actividad locomotora de los animales y para ello, se utilizaron cajas de actividad LE 881 (Panlab, SL). Estas cajas (45 cm largo x 45 cm ancho) consisten en cuatro paredes de plexiglás montadas sobre un soporte cuadrado en cuyos laterales existen una serie de sensores fotoeléctricos de movimiento (IR, *Infrared*) que permiten tanto el estudio de la actividad horizontal como el de la vertical. En este trabajo sólo se medía la actividad horizontal y se registraba durante 24 horas respetando el ciclo luz/oscuridad y las mismas condiciones de iluminación no aversivas que tienen los animales durante la estabulación. El agua y la comida se suministraba en cantidad suficiente en el momento de iniciar la prueba. Los resultados se recogían en intervalos de 1 hora, en un ordenador contiguo, mediante la utilización de un software especializado (Actitrack, PANLAB, SL). Así, en este trabajo se han medido como indicadores de actividad, parámetros como la distancia total recorrida por el animal en 24 horas (cm) o la velocidad media (cm/s).

5.2.2. Cinta giratoria sinfín (*Treadmill test*)



La cinta giratoria sin fin permite estudiar determinadas capacidades motoras como son la marcha y la coordinación motora. El aparato 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 S.A., 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 presenta una buena coordinación motora y por lo tanto no es capaz de correr con normalidad. Al inicio del experimento, el animal se coloca en el extremo de la cinta orientado en dirección contraria al sentido del movimiento. En este trabajo se ha registrado el número total de descargas recibidas (número de shocks) o el tiempo acumulado de shock (tiempo de shock en seg.) por animal y por condición utilizada.

5.2.3. Reflejo del sobresalto (*Startle Reflex Test*)



El test del reflejo del sobresalto permite estudiar la inhibición mediada por un prepulso (*Prepulse Inhibition, PPI*), el cual es un fenómeno neurológico que actúa como mecanismo de control de la reacción de sobresalto. La PPI ocurre cuando un preestímulo de intensidad más débil (prepulso) inhibe la reacción de un organismo a un segundo estímulo más fuerte (pulso). Este fenómeno es probablemente la consecuencia de un procesamiento de señales sensoriales del tronco cerebral. La función de la inhibición por prepulso es impedir que un estímulo inesperado interrumpa el procesamiento de análisis de un impulso sensorial precedente, sea de la misma o de distinta modalidad.

El aparato (Panlab, SL) consistía en una caja insonorizada, acoplada a un sistema de ventilación dentro de la cual se hallaba una plataforma metálica en donde colocábamos al animal a su vez dentro de un tubo de plexiglás. La base estaba en contacto directo con una unidad piezoeléctrica que detectaba y transducía cualquier señal de movimiento que se producía sobre la plataforma. En este trabajo se ha utilizado el estímulo acústico. El sonido se emitía a través de un altavoz

instalado dentro de la cámara y conectado a un módulo desde el cual se seleccionaban los distintos parámetros de frecuencia e intensidad de sonido.

El protocolo que se ha seguido en este trabajo consistía en aplicar un primer test de habituación en el cual se registraba la respuesta del animal a las distintas intensidades tanto de los prepulsos como de los pulsos. Esto tenía como fin el determinar la sensibilidad (o *sensitivity gain*) adecuada para cada animal en el test propiamente dicho. La intensidad del pulso era de 120 db y la de los prepulsos, de intensidad creciente, de 74, 78, 82, 86 y 90 db. Otros datos a tener en cuenta eran, el tiempo entre la administración del prepulso y el pulso, que era de 100 ms y la frecuencia, tanto del pulso, como del prepulso que se establecía en 8000 Hz. Tanto durante la habituación como el test, el sonido de fondo o *background* era de 70 db.

El protocolo del Test consistía en 5 minutos de habituación, sólo con el sonido de fondo (70 db) seguido de la administración randomizada, cada 15 seg de cada uno de los pasos o *trials* que consistían bien en el pulso sólo, en el pulso precedido de un prepulso (con 5 intensidades diferentes) o en la ausencia de estímulo. Cada condición era repetida 6 veces por lo que el protocolo finalizaba tras ejecutarse los 42 pasos o *trials* (7 condiciones x 6 veces = 42 pasos). En total, la duración del test por animal era de unos 17 min.

5.3. Procedimiento de estereotaxia e inyección viral

Para la administración de los virus adenoasociados (AAVs) en el núcleo estriado, in vivo, se ha utilizado el procedimiento de estereotaxia basado en un sistema tridimensional de ejes y coordenadas espaciales que nos permitían buscar puntos específicos en el cerebro del ratón. Con la ayuda de un atlas (*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Paxinos & Franklin, 1997) seleccionamos las coordenadas más adecuadas para nuestro propósito que era el de inyectar en el núcleo estriado. Las coordenadas vienen dadas como distancias tridimensionales en mm (x, y, z) a dos puntos de referencia, fácilmente identificables, en el cerebro del ratón, como son *bregma* y *lambda*. En nuestro caso, tomamos como punto de referencia el punto *bregma*, formado por la intersección entre la sutura sagital y la coronal. Seleccionamos las coordenadas descritas a continuación:

+ 0.7 mm R/C*

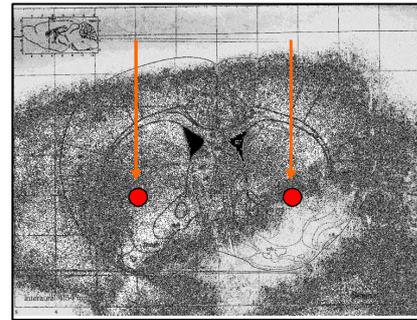
± 2 mm M/L*

- 3 mm D/V*

*R/C: *rostro-caudal*

*M/L: *medio-lateral*

*D/V: *dorso-ventral*



(*Extraído de The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Paxinos & Franklin, 1997*)

El aparato consistía en un soporte en donde se colocaba al animal, el cual se inmovilizaba con ayuda de unas barras para los oídos y una abrazadera para la nariz. El resto del aparato lo completaban dos piezas o “brazos”, uno a cada lado del soporte que contenían los distintos ejes graduados que nos permitirían buscar las coordenadas espaciales de interés. En uno de los brazos se acoplaba el trepanador que nos serviría para realizar orificios en el cráneo del ratón y en el otro, se acoplaba la bomba de infusión sobre la que iría la jeringuilla de 5 μ l (*Hamilton*) para la inyección del virus.



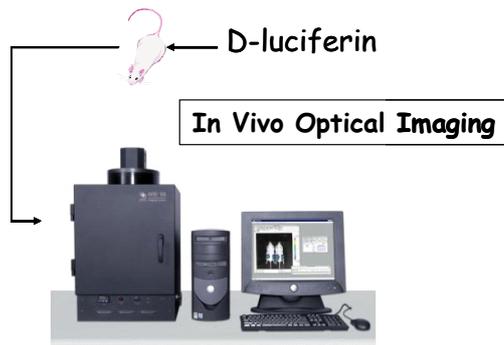
Primero, se anestesiaba el animal con una mezcla de medetomidina (*Domtor®*, Pfizer)/ketamina (*Imalgene 500®*, Merial) a una dosis de 1 mg/kg y 75 mg/kg respectivamente, por vía intraperitoneal. Pasados 5-10 min en los que el animal ya no respondía a los estímulos nociceptivos, se rasuraba la cabeza del animal y se le inmovilizaba en el aparato (Panlab, S.L.). Para ello, primero se colocaban las barras para los oídos, teniendo especial cuidado en no dañar los tímpanos, seguido de la abrazadera para la nariz y se comprobaba que la cabeza quedara totalmente fijada y no se moviera lateralmente. Una vez hecho esto, se limpiaba la cabeza del animal con etanol al 70% y con ayuda de unas tijeras finas, se realizaba un corte sobre la piel de

la cabeza de alrededor de 1 cm de largo. Sobre la superficie del cráneo, se identificaban las suturas coronal y sagital, y el punto de intersección de ambas, el *bregma*. Con ayuda de los ejes, anotábamos las coordenadas de dicho punto y movíamos el trepanador a la distancia necesaria hasta llegar a las coordenadas de nuestros puntos de inyección, es decir, 0.7 mm en sentido rostral y 2 mm en sentido lateral, en ambas direcciones ya que inyectábamos en ambos hemisferios. Una vez en los puntos de inyección, se realizaban pequeños orificios en el cráneo mediante trepanación, con cuidado de no perforar el cerebro. El siguiente paso consistía en colocar la jeringuilla, previamente cargada con el virus a inyectar, en el brazo del estereotáxico y colocarla justo en la entrada de los orificios realizados. Entonces, se anotaban las coordenadas en el eje z o dorso-ventral y lentamente, se hacía bajar la aguja, 3 mm hacia la parte ventral. A continuación se procedía a la inyección con la ayuda de una bomba de infusión (Cressant et al., 2004) que administraba el virus a velocidad constante, 200 nl/min. Se ha seguido el protocolo descrito por Cressant et al. que consistía en inyectar la mitad de volumen (1.5 µl), esperar 2 min, retroceder 0.5 mm hacia la parte dorsal e inyectar los 1.5 µl restantes. Tras esto, se esperaba 5 min y se desplazaba la jeringuilla lentamente hasta la superficie del orificio, y antes de sacarla definitivamente del cerebro, se esperaban otros 2 min. El mismo procedimiento se seguía a la hora de realizar la inyección en el otro hemisferio.

Después de las inyecciones, se procedía a la sutura de la herida con hilo de seda trenzada (5/0, Laboratorios Aragón, S.A.) y se administraba povidona yodada (*Betadine*®), de forma tópica. Para revertir los efectos de la anestesia y conseguir un despertar rápido y controlado del animal (10-15 min) se inyectaba atipamezol (*Antisedan*®, Pfizer) por vía subcutánea a una dosis de 2 mg/kg. También se administraba un analgésico opiáceo, buprenorfina (*Buprex*®, Schering-Plough), por vía subcutánea, a una dosis de 0.05 mg/kg. Finalmente se colocaba al animal en una jaula limpia y para facilitar el acceso a la comida, se ponían pellets de comida humedecidos con agua cerca del animal. Durante los 2 días posteriores a la intervención se continuaba administrando analgésico y durante una semana se realizaba un seguimiento de la recuperación del animal.

N.B.: A lo largo de la intervención se tomaban ciertas precauciones en referencia al bienestar animal. Una hacía referencia a la administración de suero fisiológico en los ojos abiertos del animal para evitar su sequedad con la consiguiente pérdida de visión. Y la otra consistía en usar una manta eléctrica sobre la cual se colocaba al animal para evitar la pérdida de calor corporal durante la intervención.

5.3. Técnicas de imagen in vivo: bioluminiscencia



El análisis de la bioluminiscencia (medida de la actividad luciferasa in vivo) ha permitido el seguimiento de los virus inyectados en el núcleo estriado. Para la monitorización y cuantificación de la expresión de la luciferasa, se ha utilizado el sistema de captación de imagen bioluminiscente IVIS 50. La captura de las imágenes y su posterior procesamiento para la cuantificación se realizó mediante el software Living Image 2.20.1 Igor Pro4.06A.

Para la realización de estos estudios, primero, se administraba por vía intraperitoneal el sustrato D-luciferina (16 mg/kg), y transcurridos 5-10 min, se anestesiaba al animal con la mezcla de alcoholes AVERTIN (0.5 µg/kg). Una vez dormido el animal, se introducía en la caja negra del aparato y se comprobaba que el área anatómica de interés, en nuestro caso la cabeza del animal, estuviera bien centrada en el campo de exposición realizando para ello exposiciones muy cortas. Una vez hecho esto, se capturaba la emisión de luz a un tiempo concreto después de la administración del sustrato, que en este trabajo era de 14 min post-luciferina. El software realizaba una primera foto en blanco y negro del animal sobre la cual se superponía la representación de la luz emitida durante el tiempo de exposición fijado por nosotros, el cual era de 10 min. Así, en la imagen final se podrían correlacionar las áreas de expresión de luciferasa con el área anatómica correspondiente. Dicha imagen mostraba la actividad luciferasa mediante el uso de un código de colores que van desde el rojo hasta el azul, siendo el rojo el color que representaba los puntos de mayor emisión lumínica y el azul, los de menos. Era importante, una vez fijados los distintos parámetros como eran la sensibilidad y el tiempo de captación, aplicar las mismas condiciones en todas las imágenes que queríamos comparar dentro de un mismo experimento.

A posteriori, y con la ayuda del software antes mencionado se calculaba la actividad luciferasa midiendo el número total de fotones por segundo capturados por la cámara. Los resultados se

expresaban siempre en fotones por segundo, por centímetro cuadrado y por esteradian ($\text{seg}/\text{cm}^2/\text{sr}$).

Para estudiar mejor la localización de la expresión de la luciferasa en el cerebro del ratón se han captado imágenes bioluminiscentes de cerebros aislados, por un lado y de cortes coronales de cerebro, por otro. La administración del sustrato D-luciferina se realizaba con el animal vivo tal y como se describe en el apartado anterior. Para el procesamiento del cerebro en cortes coronales, se utilizaba un *chopper* (*Mc Illwain™ Tissue Chopper*, PANLAB S.L.) con el que se obtenían cortes de 1 mm de grosor.

Reactivos y soluciones

- **AVERTIN**: mezcla de 3 alcoholes: 2,2,2-Tribromethanol 97% + 2,2,2-Tribromoethanol 97% (Sima Aldrich cat nº T4,840-2) + tert-amyl-alcohol. Preparar de manera extemporánea una disolución de 20 mg/ml en PBS1X. Filtrar por 0.22 μm .
- **D-luciferina**: D-Firefly-Luciferin en PBS1X. Filtrar por 0.22 μm (*Xenogen*, Alameda, C.A.)

6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se ha realizado con la ayuda del programa SPSS (SYSTAT software). Para el tratamiento de los resultados de los experimentos in vitro, se ha utilizado el test de Student (tamaño muestral pequeño y comparación de dos grupos) mientras que para los experimentos in vivo, se ha utilizado el test de la varianza one-way ANOVA (diferencias entre más de tres grupos y medidas repetidas). En todos los casos, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas (*) cuando el valor de $p < 0.05$ y muy significativas (**) cuando $p < 0.01$.

7. Listado de plásmidos y virus

Plásmidos utilizados en este trabajo:

GFP-DYRK1A

El cDNA de DYRK1A corresponde a la isoforma de 754 aa humana. Clonado en el plásmido de expresión pEGFPC-1, seguido del gen reportero GFP, bajo el control de promotor CMV. Generado en el laboratorio de la Dra Susana de la Luna (*).

GFP-DYRKNH

Subclonaje por restricción en pEGFPC-1 de un fragmento que comprende de 378-616 nt generado por PCR sobre pHA-DYRK1A (humano) con los cebadores SacDYRK1/SP6 y ligación en T-vector. Generado en el laboratorio de la Dra Susana de la Luna.

HA-DSCR1

El cDNA de DSCR1/CALP1-L fue clonado en el plásmido pcDNA3-HA, bajo el control del promotor CMV. Generado en el laboratorio de la Dra Susana de la Luna.

pBSU6

Plásmido pBluescript modificado con el promotor U6 murino, específico para la RNA polimerasa III. Generosamente cedido por le Dr. Yang Shi (Harvard Medical School, Boston) (Sui et al., 2002).

pU6shDyrk1A

Plásmido pBSU6 que expresa un *short hairpin* específico para el gen DYRK1A (shDyrk1A) bajo el control del promotor U6. El shDyrk1A fue clonado en pBSU6 tras digerir éste en ApaI/EcoRI y generar un extremo romo con la actividad 3'-5' exonucleasa del fragmento klenow de la polimerasa II.

Virus utilizados en este trabajo:

AAV-shDyrk1A

Adenoasociado del serotipo 2 (AAV-2). Contiene el gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor CMV además del constructo U6-shDyrk1A clonado a partir de pU6shDyrk1A. Ambos promotores se encuentran dispuestos en orientación inversa para evitar interferencias entre ellos. La producción y generación del virus recombinante se ha realizado en la Unidad de Producción de Vectores virales (UPV) dirigida por el Dr. Miguel Chillón (CBATEG, UAB, Barcelona).

AAV-scDyrk1A

Adenoasociado del serotipo 2 (AAV-2). Contiene el gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor CMV. Contiene además el constructo U6-scDyrk1A, clonado a partir de pU6scDyrk1A, amablemente cedido por la Dra Susana de la Luna (CRG, Barcelona). Dicho constructo contiene un *short hairpin* cuya secuencia no presenta homología con el gen DYRK1A (scDyrk1A). Ambos promotores se encuentran dispuestos en orientación inversa para evitar interferencias entre ellos. La producción y generación del virus recombinante se ha realizado en la Unidad de Producción de Vectores virales (UPV) dirigida por el Dr. Miguel Chillón (CBATEG, UAB, Barcelona).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Caracterización y análisis funcional de la expresión de las subunidades del receptor NMDA de glutamato en el modelo TgDyrk1A en cerebelo y núcleo estriado.

Resultados previos del laboratorio basados en un estudio de microarrays revelaron la sobreexpresión a nivel de RNA mensajero de la subunidad NR2A del receptor NMDA de glutamato en el cerebelo de animales transgénicos. En dichos experimentos se pretendía evaluar las consecuencias de la sobreexpresión de Dyrk1A sobre la actividad transcripcional de diversos genes implicados en la fisiología del SNC. En el presente trabajo, se ha caracterizado la expresión del receptor NMDA en el modelo TgDyrk1A y se han evaluado algunas consecuencias funcionales que podrían verse afectadas por dicha desregulación. El estudio se ha limitado a dos de las áreas del cerebro que controlan procesos motores como son el cerebelo y el núcleo estriado, dada la implicación del receptor NMDA en el control motor.

1.1. Estudio de la expresión de las subunidades del receptor NMDA en el cerebelo adulto.

En primer lugar se determinó y cuantificó la sobreexpresión de Dyrk1A en el cerebelo del ratón transgénico adulto. Para ello se analizó y comparó mediante Western Blot (WB) los niveles proteicos de Dyrk1A presentes en extractos cerebelares procedentes tanto de ratones control como de transgénicos, todos de la misma edad (7 meses) (Fig. 1A). Se observó una sobreexpresión de la proteína en el cerebelo del ratón TgDyrk1A que se estimó del 25%. (Fig 1.B).

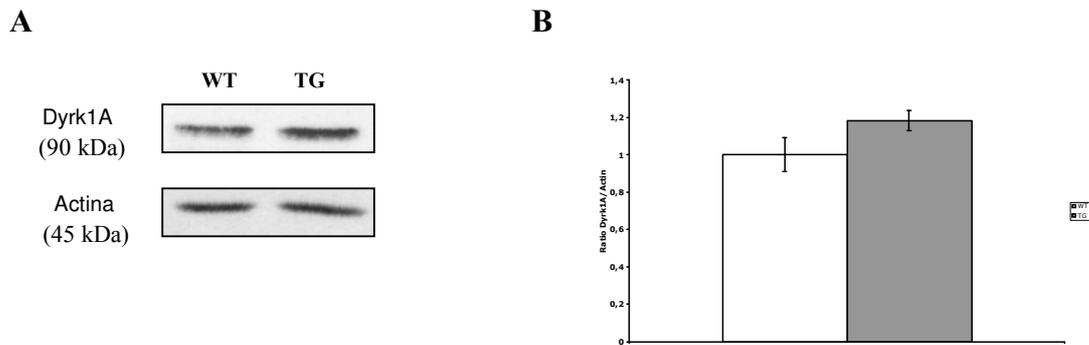


Fig. 1: Análisis comparativo de la expresión de Dyrk1A en el cerebelo adulto del ratón TgDyrk1A con respecto al control. A): Inmunodetección de Dyrk1A mediante WB a partir de extractos cerebelares de animales adultos tanto de TgDyrk1A como de animales control. La carga se realizó con 80 µg de proteína de cada muestra y se resolvieron en un gel al 7.5% de acrilamida. La membrana de nitrocelulosa se hibridó con un anticuerpo policlonal anti-Dyrk1A. Se utilizó la actina como control de carga usando el anticuerpo policlonal anti-Actina. Se muestra una imagen representativa. **B):** Cuantificación mediante densitometría de bandas de los resultados obtenidos en el WB. Los resultados se representan como la media ± SEM, n=4 y se expresan como niveles relativos de proteína de Dyrk1A/Actina.

A continuación, se analizó mediante Western Blot la expresión a nivel proteico de la subunidad NR2A del receptor NMDA de glutamato en el cerebelo de ratones control y transgénicos. Los resultados obtenidos revelaron la sobreexpresión de NR2A en el cerebelo del animal transgénico a nivel proteico (Fig. 2A) confirmando los datos obtenidos con los experimentos de microarrays. El receptor de NMDA es un heterodímero compuesto por dos subunidades NR1, que son las constitutivas, y dos subunidades mayoritariamente del tipo NR2, que son las que confieren la variabilidad funcional al receptor. Hasta ahora se conocen 4 subtipos de subunidades NR2: NR2A, NR2B, NR2C, NR2D (Villmann and Becker, 2007). Se ha descrito que la desregulación de una de las subunidades del receptor puede provocar cambios en la expresión de las otras. Así, en un estudio realizado en células PC12, la expresión ectópica de NR2A, NR2B, NR2C o NR2D provoca un aumento en los niveles proteicos de NR1 y el ensamblaje de receptores funcionales de NMDA en membrana (Saito et al., 2003). En el cerebelo adulto se ha descrito la expresión mayoritaria de heterodímeros formados por NR1 /NR2A/NR2C, siendo la única estructura del cerebro en expresar subunidades del subtipo NR2C, mientras que la expresión de NR2B queda limitada a estadios tempranos del desarrollo (Llansola et al., 2005). En el presente trabajo, el análisis por WB reveló que en el cerebelo del ratón adulto se expresaba no sólo la subunidad NR2A sino también la subunidad NR1, que es la constitutiva, y la NR2C mientras que los niveles proteicos de NR2B permanecieron indetectables (Cull-Candy et al., 2001). Además, se observó que NR1 y NR2C, al igual que NR2A, se hallaban sobreexpresadas en el cerebelo de ratones transgénicos (Fig. 2A).

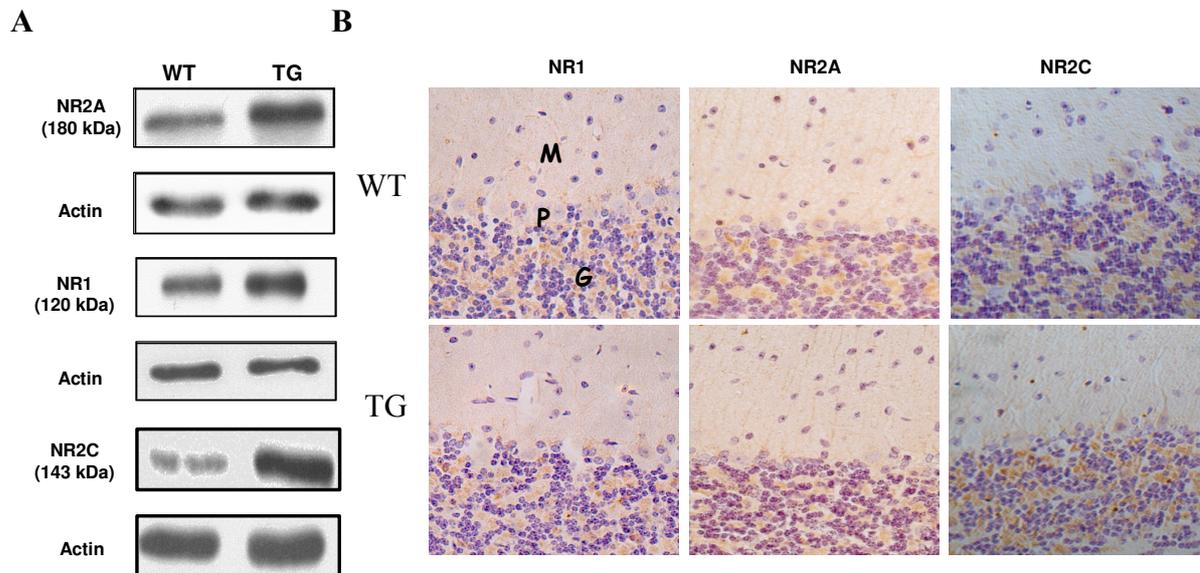


Fig. 2: Patrón de expresión de las subunidades del receptor NMDA de glutamato en el cerebelo de ratones adultos TgDyrk1A y controles. **A):** Análisis mediante WB a partir de extractos proteicos de homogenados cerebelares. La carga se realizó con 80 μ g de proteína por muestra y se resolvieron en un gel al 8% de acrilamida. Las distintas membranas de nitrocelulosa se hibridaron con los anticuerpos policlonales para las distintas subunidades: anti-NR2A, anti-NR1 y anti-NR2C. Se muestran imágenes representativas para cada WB. La actina se utilizó como control de carga en todos los casos usando el anticuerpo policlonal anti-Actina. **B):** Inmunohistoquímica sobre cortes sagitales parafinados de cerebelo. Imágenes representativas de la expresión de las distintas subunidades en la corteza cerebelar de animales adultos, TgDyrk1A y controles. Fotomicrografías tomadas a 400x. M, capa molecular; P, capa de Purkinje; G, capa granular.

También se analizó si la desregulación proteica de las subunidades NR2A, NR1 y NR2C iba acompañada de cambios en la localización celular. Para ello realizamos un análisis inmunohistoquímico sobre cortes parafinados de cerebelo de ratones TgDyrk1A y ratones control (Fig. 2B). Para las tres subunidades analizadas se observó un patrón similar de expresión que consistía en una inmunorreactividad de leve a moderada en el neuropilo de la capa molecular, especialmente en las dendritas de algunas células de Purkinje, siendo el marcaje extensible a los propios somas de dichas células de Purkinje. El mayor marcaje se observó en la capa granular, no en los somas de las células granulares sino en los glomérulos existentes entre ellas. No se detectaron diferencias entre genotipos en la distribución de las distintas subunidades sugiriendo que los cambios de expresión eran independientes de la localización celular.

1.2. Estudio de la expresión de las subunidades del receptor NMDA en el cerebelo a estadios tempranos postnatales (P7 y P14).

Dado que la composición de las distintas subunidades que forman el receptor NMDA varía a lo largo del desarrollo normal del cerebelo, se decidió estudiar la expresión de las distintas subunidades no sólo en el ratón adulto sino también en dos estadios tempranos del desarrollo, a 7 y a 14 días postnatales. (P7 y P14).

1.2.1. Estudio de la expresión de las subunidades del receptor NMDA a P14.

En este estadio del desarrollo se analizaron las subunidades NR1, NR2A, NR2B y NR2C, y tal y como ha sido descrito (Cull-Candy et al., 2001), se pudo detectar la expresión de las cuatro (Fig. 3A). El análisis mediante WB reveló sobreexpresión de cada una de las distintas subunidades analizadas en el ratón transgénico con respecto al control (Fig. 3A). El análisis inmunohistoquímico (Fig. 3B) puso de manifiesto una inmunorreactividad moderada en la capa granular y la presencia de células de Purkinje selectivamente teñidas, presentando una inmunorreactividad de fuerte a moderada. Este patrón de expresión era similar al observado en los animales adultos. En este estadio no se apreciaron diferencias en el patrón de distribución de las distintas subunidades entre genotipos.

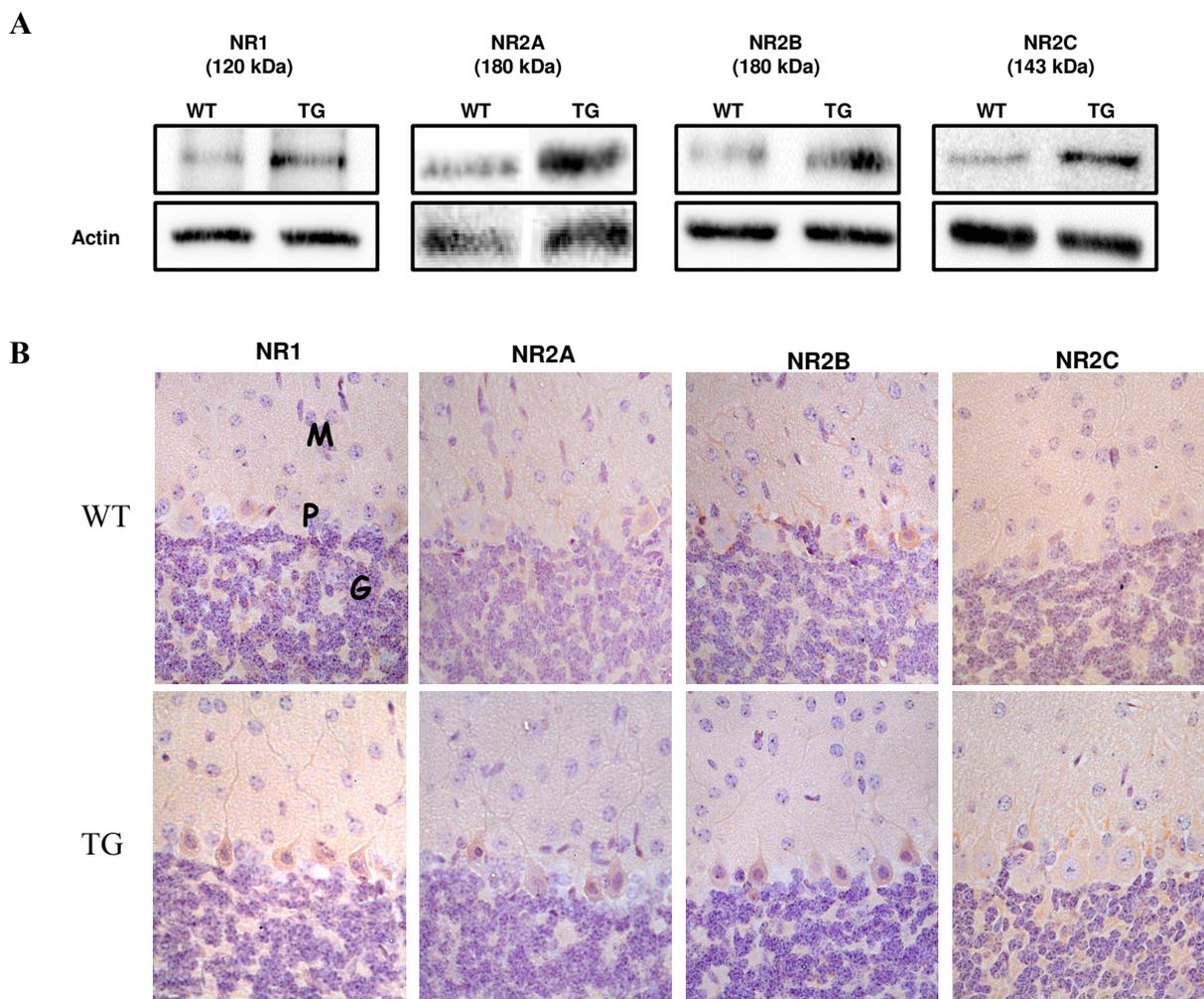


Fig. 3: Patrón de expresión de las subunidades del receptor NMDA de glutamato en ratones P14 TgDyrk1A y controles. A): Análisis mediante WB a partir de extractos proteicos de homogenados cerebelares. La carga se realizó con 80 µg de proteína por muestra y se resolvieron en un gel al 8% de acrilamida. Las distintas membranas de nitrocelulosa se hibridaron con los anticuerpos policlonales para las distintas subunidades: anti-NR2A, anti-NR2B, anti-NR1 y anti-NR2C. Se muestran imágenes representativas para cada WB. La actina se utilizó como control de carga en todos los casos usando el anticuerpo policlonal anti-Actina. **B):** Inmunohistoquímica sobre cortes sagitales parafinados de cerebelo. Imágenes representativas de la expresión de las distintas subunidades en la corteza

cerebelar de animales de 14 días, TgDyrk1A y controles. Fotomicrografías tomadas a 400x. M, capa molecular; P, capa de Purkinje; G, capa granular.

1.2.2. Estudio de la expresión de las subunidades del receptor NMDA a P7.

En dicho estadio, se analizó la expresión de las cuatro subunidades: NR1, NR2A, NR2B y NR2C, sin embargo sólo se detectó proteína para NR1, NR2A y NR2B. La subunidad NR2C no se detectó, lo que coincide con datos previos de la literatura que indican que NR2C no se expresaría en esta etapa del desarrollo (Cull-Candy et al., 2001). El análisis mediante WB reveló una reducción de los niveles proteicos de las subunidades NR2A, NR2B y NR1 en el animal transgénico con respecto al control. (Fig. 4A).

En el estadio postnatal P7, el cerebelo está todavía en desarrollo y presenta una estructura macroscópica de capas consistente en una capa granular externa, una capa de células de Purkinje en desarrollo y una capa granular interna que se irá transformando en la futura capa granular. Esta estructura se mantenía de forma similar entre ambos genotipos. El análisis inmunohistoquímico reveló una tinción leve en la capa granular interna mientras que la tinción era más bien moderada en ciertas neuritas de la capa de Purkinje. Una vez más, no se observaron diferencias en la localización de las distintas subunidades entre ambos genotipos (Fig. 4B).

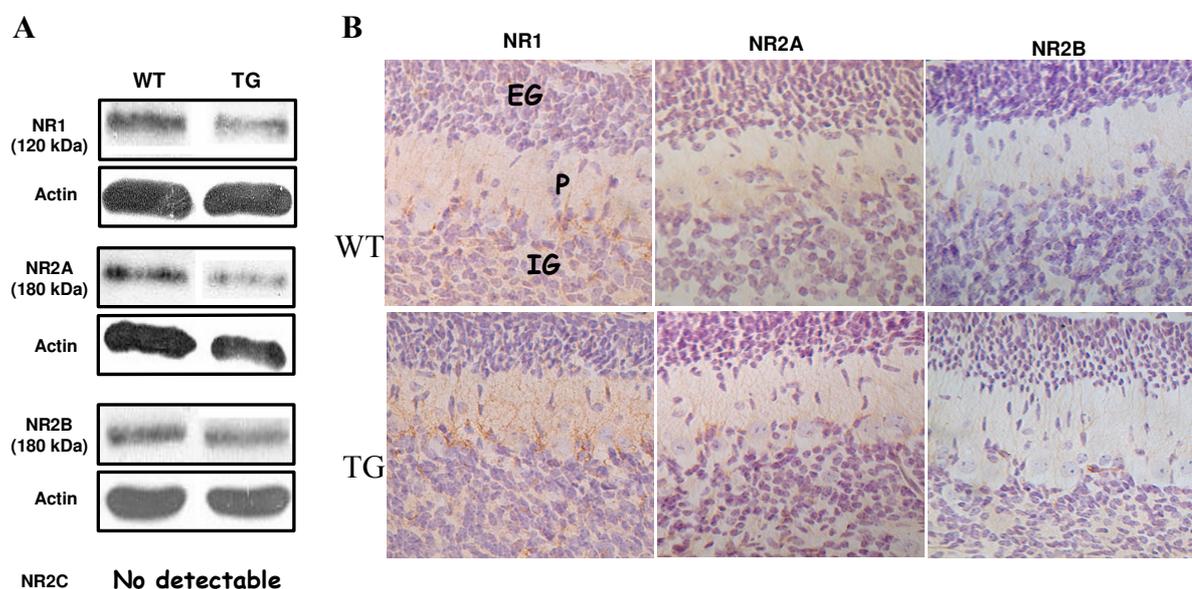


Fig. 4: Patrón de expresión de las subunidades del receptor NMDA de glutamato en ratones P7 TgDyrk1A y controles. A): Análisis mediante WB a partir de extractos proteicos de homogenados cerebelares. La carga se realizó con 80 µg de proteína por muestra y se resolvieron en un gel al 8% de acrilamida. Las distintas membranas de nitrocelulosa se hibridaron con los anticuerpos policlonales para las distintas subunidades: anti-NR2A, anti-NR1 y anti-NR2B. Se muestran imágenes representativas para cada WB. La actina se utilizó como control de carga en todos los casos usando el anticuerpo policlonal anti-Actina. **B):** Inmunohistoquímica sobre cortes sagitales parafinados de cerebelo. Imágenes representativas de la expresión de las distintas subunidades en la corteza

cerebelar de animales de 7 días, TgDyrk1A y controles. Fotomicrografías tomadas a 400x. M, capa molecular; P, capa de Purkinje; G, capa granular.

El conjunto de resultados derivados del análisis longitudinal (P7, P14, adulto) de la expresión de las subunidades del receptor NMDA de glutamato en el cerebelo pone de manifiesto una desregulación en la expresión de dichas subunidades en cada uno de los estadios, sin cambios en la localización celular. Se evidencia un incremento en la expresión de subunidades en el cerebelo adulto y a P14, mientras que una reducción en el estadio P7. Esta aparente discrepancia podría explicarse por un efecto en la interpretación celular de las distintas señales en el cerebelo en desarrollo diferente a la que se da en una estructura totalmente definida. De hecho, estudios del transcriptoma cerebelar en el desarrollo del ratón han demostrado una gran variabilidad en la expresión génica (Lim et al., 2004).

1.3. Estudio de la expresión de las subunidades del receptor NMDA en cultivos primarios de células granulares (CGN, *Cerebellar Granular Neurons*)

Se estudió si la desregulación del receptor de NMDA observada in vivo se mantendría en un sistema in vitro como era el de cultivos primarios de células granulares de cerebelo (CGN). Con el fin de reducir al máximo la variabilidad y aplicar unas condiciones homogéneas al análisis diferencial, los cultivos de ambos genotipos se establecieron en paralelo. Se utilizaron capas de ratones control y de ratones TgDyrk1A homocigotos, de 7 días de edad (P7). Se determinó la expresión de Dyrk1A y de las subunidades NR2A y NR1 a los 7 días después de establecer el cultivo (DIV7, *Day In Vitro 7*) siendo éste un momento en que las neuronas se hallaban bien diferenciadas. Mediante WB, se detectó una sobreexpresión de Dyrk1A en los cultivos procedentes de TgDyrk1A (Fig. 5A) que se estimó de aproximadamente el doble (Ratio Tg/Wt = 2.12) (Fig. 5B). Además, se detectó la presencia de las subunidades NR1, NR2A y NR2B y no la de NR2C, en el cultivo neuronal maduro, acorde con lo descrito en la literatura (Janssens and Lesage, 2001), observándose una sobreexpresión de la subunidad NR2A en los cultivos transgénicos (Fig 5A) que se estimó de aproximadamente el doble (Ratio Tg/Wt = 1.9). Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de NR1 y NR2B entre genotipos (Fig 5B).

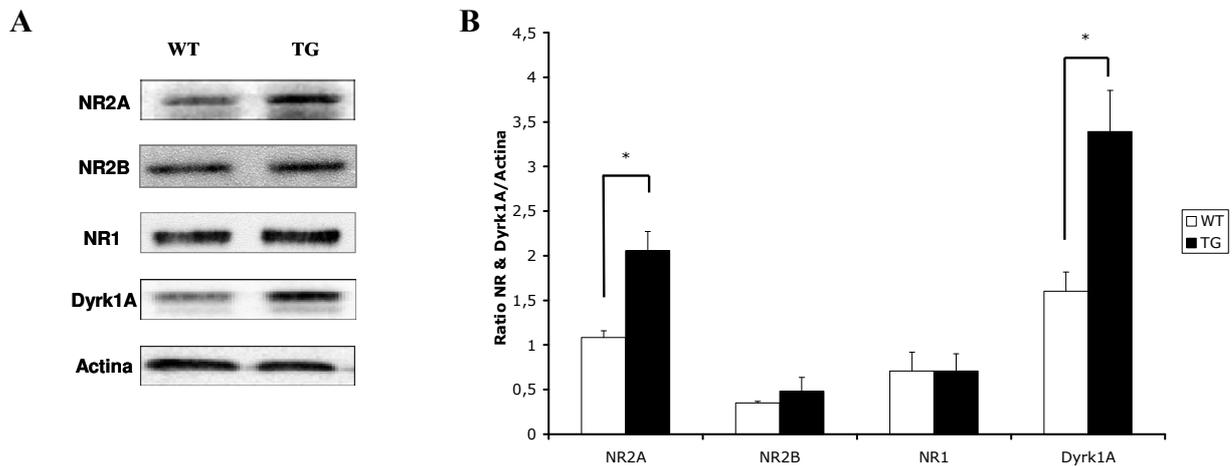


Fig. 5: Caracterización de la expresión de Dyrk1A y de las subunidades NR2A y NR1 del receptor NMDA de glutamato en cultivos de CGNs de ratones TgDyrk1A y control. A): Análisis mediante WB a partir de extractos proteicos procedentes de cultivos primarios de CGN procesados a DIV7. Los cultivos de TgDyrk1A y controles fueron establecidos en paralelo a partir de la corteza cerebelar de ratones P7 y mantenidos bajo las mismas condiciones. La carga se realizó con 30 μ g de proteína por muestra y se resolvió en un gel al 7.5% de acrilamida. Las membranas de nitrocelulosa se hibridaron con los anticuerpos policlonales anti-Dyrk1A, anti-NR2A y anti-NR1. Se utilizó la actina como control de carga usándose el anticuerpo policlonal anti-Actina. Se muestran imágenes representativas de cada WB. **B):** Cuantificación mediante densitometría de bandas de los resultados obtenidos en el WB. Los resultados se representan como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes y se expresan como niveles relativos de proteína de NR o Dyrk1A/Actina. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Prueba T-Student.

1.4. Análisis funcional de los canales de NMDA.

A continuación, se estudió si la sobreexpresión de NR2A en las neuronas TgDyrk1A podría afectar la funcionalidad de los canales NMDA. Experimentos realizados en el laboratorio por el Dr. X. Altafaj en sinaptosomas procedentes de cerebelo adulto, mostraron que la administración de 100 μ M de NMDA producía una mayor entrada de Ca^{2+} intracelular en los sinaptosomas de animales transgénicos. Por otro lado, se realizaron experimentos en colaboración con el grupo del Dr. V. Ceña en cultivos primarios de CGNs, procedentes de ratones control y de ratones TgDyrk1A, a DIV12. Para ello, se midió la cinética del calcio entrante (Ca^{2+}) tras activar los canales de los receptores NMDA de glutamato mediante administración de 10 μ M de NMDA. Los resultados revelaron que si bien el pico de concentración y la amplitud del Ca^{2+} entrante eran similares entre genotipos, la recuperación de los niveles basales de calcio dentro de la célula, medida por la constante de recuperación Tau (τ) se producía de forma más lenta en las CGNs transgénicas (ver Altafaj et al., ANEXO). Todos estos resultados demuestran que si bien se produce un aumento del Ca^{2+} entrante en la células tras activación de los canales de NMDA en el cerebelo de los animales TgDyrk1A, este efecto se vería compensado por los sistemas de tamponamiento del Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, esta compensación conduciría a una recuperación de los niveles basales de Ca^{2+} de forma más lenta en el animal TgDyrk1A, sugiriendo posibles consecuencias en aquellas vías de señalización intracelular mediadas por el calcio.

1.4.1. Estudio de la sensibilidad a estímulos excitotóxicos en CGNs.

La excitotoxicidad es el proceso por el cual se produce una sobreactivación de los receptores de NMDA de glutamato seguida de una entrada masiva de calcio dentro de la célula, lo que activa una serie de mecanismos intracelulares que llevan a la muerte celular por apoptosis. Teniendo en cuenta los resultados previos, en este trabajo nos planteamos estudiar la posible susceptibilidad diferencial de las CGNs control y TgDyrk1A, a una entrada masiva de calcio provocada por una sobreactivación de los canales de NMDA.

Se cultivaron las células en presencia del estímulo excitotóxico (glutamato) a distintas concentraciones (25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M y 200 μ M) y 24 h después se evaluó la respuesta al daño provocado mediante el ensayo MTT valorando la actividad metabólica de los distintos pocillos tratados y no tratados, y comparando entre genotipos. Los resultados mostraron una reducción en la supervivencia neuronal debida al tratamiento con glutamato que era dosis dependiente, observándose una respuesta similar en los cultivos procedentes de ambos genotipos (Fig. 6A). El glutamato es un agente no selectivo de los canales de NMDA, por lo que para confirmar que la muerte observada era mediada mayoritariamente por medio de los receptores NMDA, se incubaron las células en presencia o ausencia del antagonista no competitivo de dichos receptores, MK-801. En presencia de MK-801, se observó una supervivencia de los cultivos, indicativo de su efecto bloqueante. Este efecto fue similar para ambos genotipos (Fig. 6B)

Estos resultados indican que la desregulación de los receptores NMDA presente en los animales TgDyrk1A no tendría consecuencias sobre la susceptibilidad a un estímulo excitotóxico.

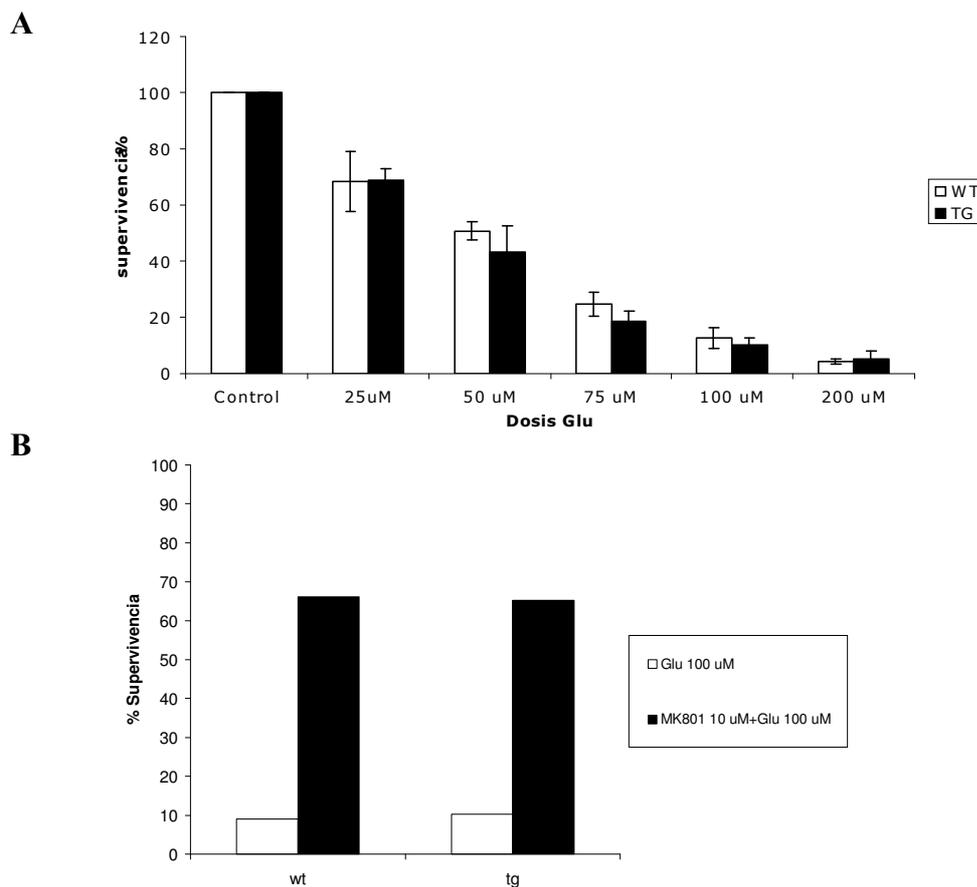


Fig.6: Estudio del efecto excitotóxico del glutamato sobre la viabilidad neuronal de cultivos de CGNs procedentes de ratones TgDyrk1A. A): Efecto excitotóxico del glutamato sobre CGNs, comparando la sensibilidad de los cultivos de CGNs control y TgDyrk1A. Los cultivos fueron establecidos en paralelo y mantenidos bajo las mismas condiciones hasta la realización del experimento, a DIV7. El efecto citotóxico del glutamato se analizó tras 24h de tratamiento, a DIV8, mediante el ensayo MTT. Datos representados como promedios \pm SEM, a partir de tres cultivos independientes por genotipo establecidos en paralelo, con triplicados. Los resultados se expresan como porcentajes de supervivencia tomando como referencia un 100% de supervivencia en los pocillos control o sin tratar. **B):** Análisis del efecto neuroprotector tras administración de agente bloqueante de canales de tipo NMDA sobre cultivos de CGNs control y TgDyrk1A. La administración del agente bloqueante (MK-801 a 10 μ M) se realizó 45 min previos a la del glutamato (Glu a 100 μ M). El efecto citotóxico del glutamato se analizó tras 24h de tratamiento, a DIV8, mediante el ensayo MTT. Se muestran los resultados correspondientes a uno de los cultivos paralelos representados en la Fig.6. Los datos se expresan como porcentajes de supervivencia tomando como referencia un 100% de supervivencia en los pocillos sin tratar o control.

1.5. Estudio de la expresión de las subunidades del receptor NMDA en el núcleo estriado adulto.

A continuación se estudió la expresión de las subunidades del receptor NMDA en el núcleo estriado. En primer lugar se determinó y cuantificó la sobreexpresión de Dyrk1A en el núcleo estriado del ratón transgénico adulto. Para ello comparamos mediante WB los niveles proteicos de Dyrk1A de extractos estriatales provenientes tanto de ratones control como de transgénicos de la misma edad (7 meses) (Fig. 10A). Se detectó sobreexpresión de Dyrk1A en el núcleo estriado del ratón TgDyrk1A que se estimó en un 40% (Fig. 10B).

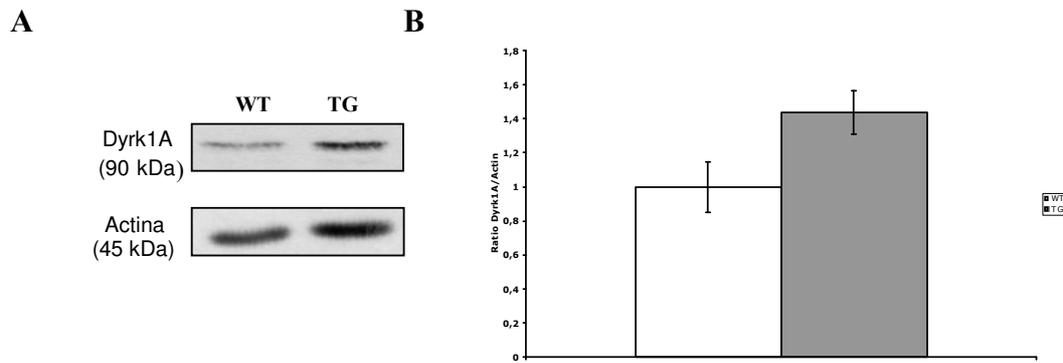


Fig. 7: Análisis comparativo de la expresión de Dyrk1A en el núcleo estriado adulto del ratón TgDyrk1A con respecto al control. A): Inmunodetección de Dyrk1A mediante WB a partir de extractos estriatales de animales adultos TgDyrk1A y control. La carga se realizó con 80 μ g de proteína de cada muestra y se resolvieron en un gel al 7.5% de acrilamida. La membrana de nitrocelulosa se hibridó con un anticuerpo policlonal anti-Dyrk1A. Se utilizó la actina como control de carga usando el anticuerpo poloclonal anti-Actina. Se muestra una imagen representativa. **B):** Cuantificación mediante densitometría de bandas de los resultados obtenidos en el WB. Los resultados se representan como la media \pm SEM, n=4 y se expresan como niveles relativos de proteína de Dyrk1A/Actina.

Posteriormente analizamos mediante WB la expresión de las subunidades NR1, NR2A, NR2B y NR2C del receptor NMDA en el núcleo estriado de ratones control y transgénicos. El análisis por WB reveló que en el estriado del ratón adulto las subunidades mayoritariamente expresadas eran NR1, NR2A y NR2B mientras que los niveles de NR2C eran difícilmente detectables (Fig. 7A) tal y como se ha descrito en la literatura (Christie et al., 1999; Jarabek et al., 2004). Se observó que todas las subunidades se hallaban sobreexpresadas en el núcleo estriado del animal transgénico adulto con respecto al control (Fig. 11A).

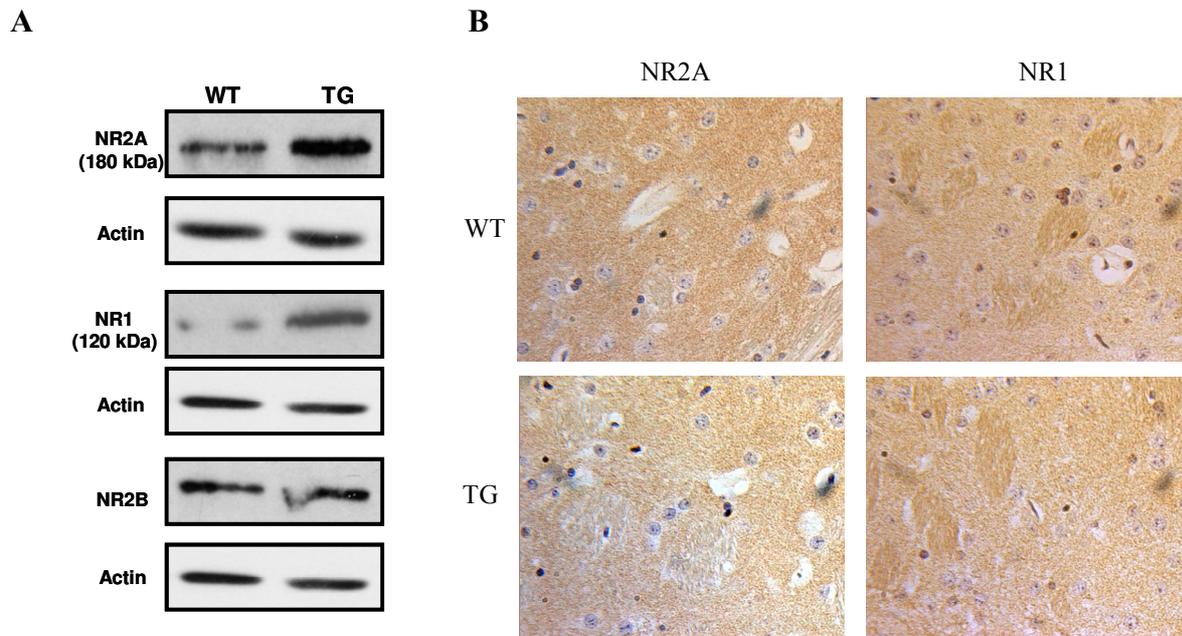


Fig. 11: Patrón de expresión de las subunidades del receptor NMDA de glutamato en el núcleo estriado de ratones adultos TgDyrk1A y controles. A): WB a partir de extractos proteicos de homogenados de núcleo estriado. En cada carril se cargaron 80 μ g de proteína, que se resolvieron en un gel al 8% de acrilamida. Las distintas membranas de nitrocelulosa se hibridaron con los anticuerpos policlonales para las distintas subunidades: anti-NR2A, anti-NR2B, anti-NR1 y anti-NR2C. La actina se utilizó como control de carga en todos los casos usando un anticuerpo policlonal anti-Actina. **B):** Inmunohistoquímica sobre cortes sagitales del núcleo estriado. Imágenes representativas de la expresión de las subunidades NR2A y NR1 en el estriado de animales adultos, TgDyrk1A y controles. Fotomicrografías tomadas a 400x.

Mediante análisis inmunohistoquímico, se estudió si la desregulación proteica de las distintas subunidades iba acompañada de cambios en la localización celular. Para ello se analizó la localización de las subunidades típicamente expresadas en el núcleo estriado adulto (NR2A, NR2B y NR1), en cortes de 5 μ m y se comparó la distribución de las distintas subunidades entre ambos genotipos (Fig. 11B). En el caso de las subunidades NR2A y NR1, se observó una inmunoreactividad difusa de intensidad leve a moderada en todo el neuropilo del estriado, tinción que resultó ser de menor intensidad que la detectada en las regiones corticales adyacentes (Ravenscroft and Brotchie, 2000). Sin embargo no se detectó tinción en el soma de determinadas neuronal, al contrario de lo que se había descrito previamente (Lai et al., 2003; Wang et al., 2004). En el caso de NR2B, no pudo detectarse su expresión por inmunohistoquímica. El mismo anticuerpo anti-NR2B se ha utilizado con éxito en el análisis realizado en el cerebelo de ratones P7 que muestran una expresión más elevada de NR2B. Es posible que los anticuerpos utilizados en el presente estudio no sean adecuados para la detección, por inmunohistoquímica de cantidades más bajas de este receptor, observadas en el estriado adulto. En el caso de NR2A y NR1, no se observaron diferencias aparentes en su localización al comparar entre genotipos (Fig. 11B).

El conjunto de estos resultados muestran la presencia en el modelo TgDyrk1A de una desregulación de las subunidades del receptor NMDA de glutamato en dos de las áreas responsables del control motor como son el cerebelo y el núcleo estriado. Dicha desregulación provoca en los cultivos de CGNs procedentes de animales TgDyrk1A, alteraciones en la cinética del calcio intracelular como consecuencia de una activación de los canales de NMDA. Sin embargo no se observan cambios en la muerte neuronal inducida por un insulto excitotóxico como es una concentración elevada de glutamato.

2. Caracterización del fenotipo motor en el ratón TgDyrk1A

Datos previos habían puesto de manifiesto alteraciones en el aprendizaje motor y en coordinación motora en el modelo TgDyrk1A (Altafaj et al., 2001; Martínez de Lagran et al., 2004). En este trabajo se ha observado una desregulación de las subunidades del receptor de NMDA en el cerebelo y el núcleo estriado de los animales TgDyrk1A. Teniendo en cuenta que la disfunción del receptor de NMDA puede conducir a la aparición de alteraciones motoras (Schlett et al., 2004; Dang et al., 2006), hemos querido profundizar en el análisis del fenotipo motor de los ratones TgDyrk1A con la aplicación de una batería de tests dirigidos a identificar cambios en la actividad horizontal, en la coordinación motora y en la capacidad de integración sensoriomotora.

2.1. Hiperactividad. Test de actimetría.

El análisis de la actividad horizontal de los animales se llevó a cabo mediante la aplicación del test de actimetría (ap. 5.2.1. de Mat. y Mét.) que proporciona una medición de la actividad en un ambiente familiar o no-aversivo. El parámetro medido fue la distancia total recorrida por los animales durante 24 h, es decir, la actividad horizontal circadiana, manteniendo intacto en todo momento el ciclo luz/oscuridad. Para la prueba, se seleccionaron dos grupos de animales adultos de 2 meses de edad, uno de animales transgénicos y otro de animales control, hermanos de camada. Los resultados revelaron una mayor distancia recorrida por los animales transgénicos con respecto a los controles siendo las diferencias de actividad estadísticamente significativas ($p=0.027$, ANOVA) (Fig 26), indicando una hiperactividad en los ratones TgDyrk1A. Si bien previamente había sido descrito que los animales TgDyrk1A presentaban un fenotipo hiperactivo, éste se había observado en entornos con un componente aversivo mostrando mayor actividad horizontal en condiciones de iluminación intensa (test del campo abierto) y mayor actividad en los brazos abiertos del laberinto (test del laberinto elevado en cruz).

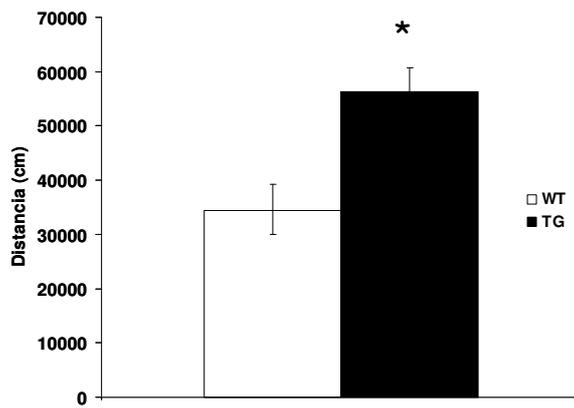


Fig.26: Análisis de la actividad horizontal en animales adultos TgDyrk1A. Se muestran los datos relativos a la distancia total en cm recorrida tanto por los ratones TgDyrk1A como controles durante 24h (control, n=6; TgDyrk1A, n=16). Los datos se expresan en promedios \pm SEM. Diferencias entre genotipos (* $p < 0.05$, ANOVA).

2.2. Alteraciones en coordinación motora. Test de la cinta giratoria sinfín.

El test de la cinta giratoria sinfín o *Treadmill Test* permite identificar cualquier alteración en la coordinación motora presente en los animales TgDyrk1A. Se utiliza un estímulo aversivo (descargas eléctricas suaves en las patas) para forzar al animal a correr y se emplean tiempos cortos para reducir la fatiga en los animales. Factores como la inclinación de la pendiente y la velocidad de la cinta se pueden regular de modo que se puede aumentar la dificultad de la prueba y poder estudiar así posibles diferencias en aquellas condiciones que requieran un mayor esfuerzo por parte de los animales. Los parámetros medidos son el número de shocks recibidos por los animales y el tiempo acumulado de shock indicativo del tiempo total en el que el animal está recibiendo los shocks.

El protocolo establecido consistió en una inclinación de la pendiente de 0° en las sesiones de aprendizaje y 20° en el resto de las sesiones. Las velocidades utilizadas fueron crecientes a lo largo de las sesiones, pasando de de 5 a 40 cm/s. En total, se aplicaron 6 sesiones consecutivas a todos los animales. Las 2 primeras sesiones de aprendizaje en las que los animales tenían que asociar el estímulo aversivo con correr no se tuvieron en cuenta en el análisis estadístico. Se observó que los animales TgDyrk1A recibían un mayor número de shocks que los animales control (** $p = 0.002$, ANOVA) (Fig. 27) indicativo de alteraciones en la coordinación motora presentes en los animales transgénicos. Resultados similares ya habían sido descritos en este modelo (Martinez de Lagran et al., 2004).

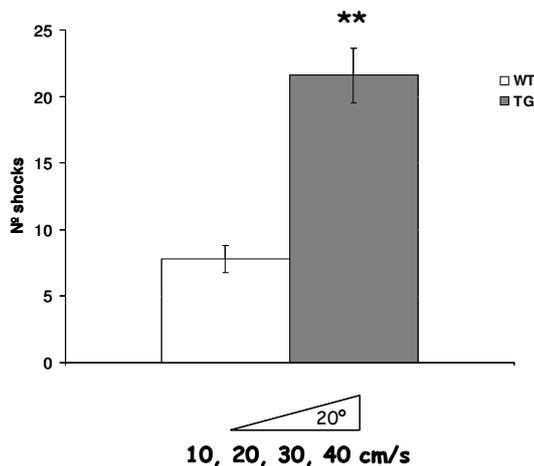


Fig. 25: Análisis de la coordinación motora en animales adultos TgDyrk1A. Test de la cinta giratoria sinfin. Protocolo consistente en 2 sesiones de aprendizaje (5cm/s; 0°) y 4 sesiones de dificultad creciente (10, 20, 30, 40 cm/s; 20°). Se muestran los datos relativos a las 4 últimas sesiones y representan el número de shocks recibidos tanto por los ratones TgDyrk1A como por los controles. (control, n=6; TgDyrk1A, n=17). Los datos se expresan en promedios ± SEM. Diferencias entre genotipos (**p<0.005, ANOVA).

2.3. Alteraciones en la integración sensorimotora. Test del reflejo del sobresalto.

En colaboración con el Dr. I. Sahún del grupo de la Dra. Dierssen se puso a punto el test del reflejo del sobresalto para analizar las posibles alteraciones en el mecanismo de inhibición por prepulso o PPI (*Prepulse Inhibition*), indicativas de déficits en la integración sensorimotora. El test consiste en aplicar dos estímulos muy seguidos, en este caso acústicos, y medir la respuesta de sobresalto del animal al segundo estímulo. Esta respuesta, en condiciones normales, es menor que cuando sólo se somete al animal a un único estímulo (ver ap. 5.3.2 Mat.y Mét.). El parámetro medido resulta de la cuantificación de la inhibición a la respuesta mediada por un prepulso y se expresa en porcentaje de inhibición.

En este trabajo, hemos aplicado el test a un grupo de animales control y a un grupo de animales transgénicos, hermanos de camada, de 2 meses de edad. Se observó que ambos genotipos presentaban un incremento en el porcentaje de inhibición mediada por prepulso a medida que aumentábamos la intensidad del mismo (Fig. 28) lo que concuerda con una respuesta normal ya que cuanto mayor es la intensidad del prepulso, mayor es el porcentaje de inhibición de la respuesta al segundo pulso (Yee et al., 2005). A todas las intensidades de prepulso aplicadas, se observó una tendencia de mayor inhibición mediada por prepulso por parte de los animales control, mientras que los animales transgénicos presentaban una inhibición menor. Aparentemente, el efecto resultaba ser mayor en las intensidades de prepulso más bajas utilizadas (74 y 78 db) (Fig. 25). No obstante, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre genotipos en ninguno de los puntos estudiados. Estos resultados sugieren de alguna forma la existencia de alteraciones en las vías que modulan el reflejo del sobresalto en los

animales TgDyrk1A, siendo más patente el efecto cuando se usan intensidades bajas de pre-estimulación, si bien las diferencias no llegan a ser significativas.

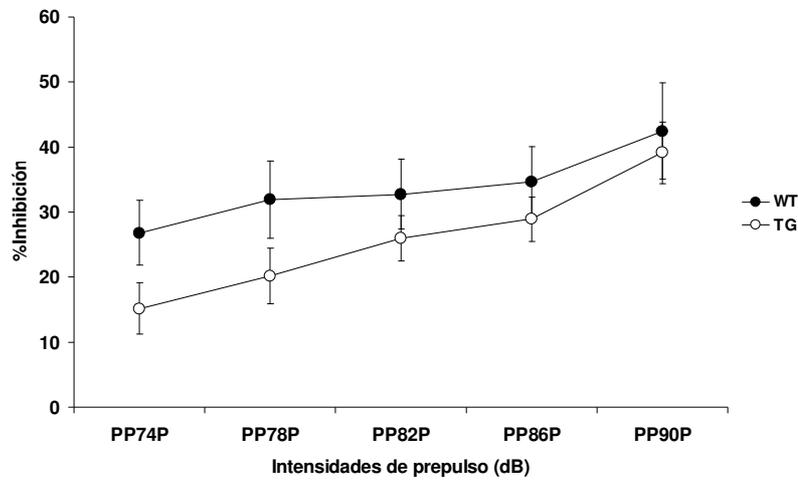


Fig. 28: Análisis de la inhibición mediada por prepulso (PPI) en animales adultos control y TgDyrk1A. Test del reflejo del sobresalto. Se muestran los datos relativos a la respuesta de sobresalto de los animales a un pulso mediada por la acción de un prepulso (animales control, n=14; animales TgDyrk1A, n=24). Tanto el pulso como el prepulso son estímulos acústicos cuyas unidades vienen referidas en decibelios de intensidad (dB) (intensidad del pulso: 120 dB; intensidades de prepulso: 74, 78, 82, 86, 90 dB). Los resultados vienen expresados como porcentajes de inhibición y se representan como promedios \pm SEM.

3. Desarrollo de una estrategia de terapia génica para corregir las alteraciones motoras causadas por la sobreexpresión de Dyrk1A en el núcleo estriado mediante RNA de interferencia.

La segunda parte de este trabajo ha consistido en desarrollar una estrategia de terapia génica basada en el RNA de interferencia para reducir la sobreexpresión de Dyrk1A en el núcleo estriado y valorar los efectos sobre las alteraciones motoras presentes en el modelo TgDyrk1A.

3.1. Construcción del plásmido inhibidor shDyrk1A

3.1.1. Identificación de la secuencia diana y diseño de los oligos

Se diseñaron shRNAs (*short hairpin RNAs*) capaces de reconocer secuencias del RNAm del gen DYRK1A comunes a la secuencia humana, de ratón y de rata. Se seleccionaron 3 secuencias a lo largo del cDNA que además cumplieron los siguientes criterios: que su longitud fuera de 21 pares de bases, que el contenido en GCs oscilara entre un 30 y un 70%, que las secuencias empezaran por tres guaninas (GGG) y se localizaran a no menos de cien nucleótidos *downstream* del ATG, que la primera base fuera una G para favorecer el inicio de la transcripción y que no tuvieran homología con otras secuencias en el genoma, análisis que se realizó mediante el programa de comparación de secuencias BLAST-n.

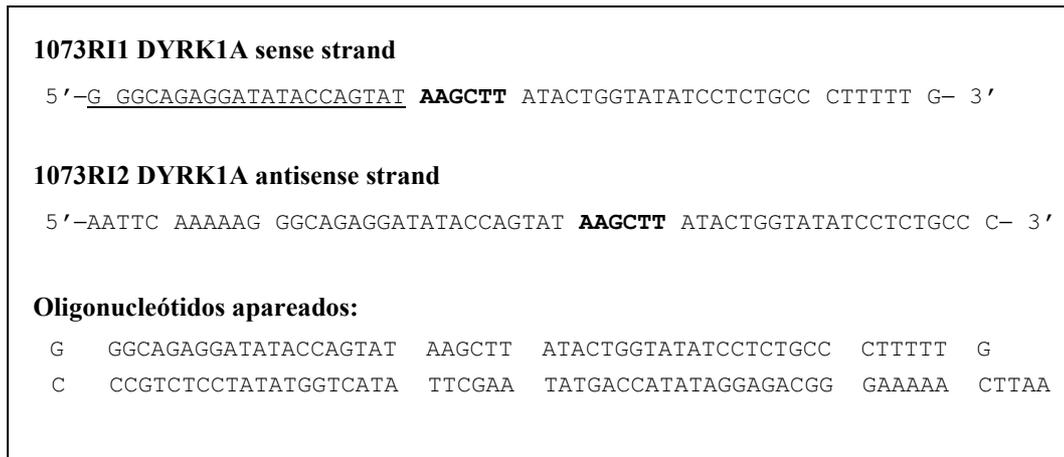
Para cada una de las secuencias elegida, se sintetizaron dos oligonucleótidos complementarios formados por la repetición en tándem y en orientación inversa, de la secuencia de 21 pares de bases y por la inserción de 6 nucleótidos palindrómicos correspondientes a la diana HindIII entre ambas. Además, se añadieron 5 timidinas en el extremo 3' como señal de terminación de la transcripción específica de la ARN polimerasa III (Fig. 12A). Con este diseño, una vez transcrito el RNAm adquiriría una conformación de doble cadena de tipo “horquilla” (*hairpin*) necesaria para activar la maquinaria celular de silenciamiento (Fig. 12B). Todos los experimentos de este trabajo se realizaron utilizando la secuencia 1073RI DYRK que corresponde a la secuencia de 21 pb con inicio en la posición 1073 tomando como referencia el cDNA de rata.

3.1.2. Clonaje en el plásmido pBSU6

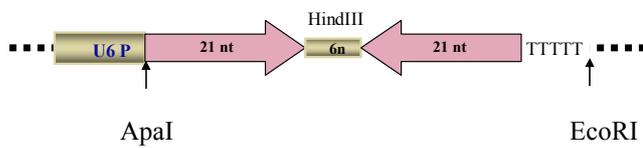
Los oligonucleótidos apareados se clonaron en un plásmido de expresión pBluescript modificado que contenía el promotor U6, específico de la RNA polimerasa III y especializado en la transcripción de fragmentos cortos de RNA. La ligación se hizo tras previa digestión con ApaI y EcoRI del plásmido. Se aprovechó la actividad exonucleasa 3'-5' de la polimerasa Klenow para formar un extremo romo en el extremo digerido con ApaI y así facilitar la clonación del inserto (Fig. 12C).

La transformación del constructo se hizo sobre la cepa JM109 de E.coli. Se seleccionaron los clones positivos mediante comprobación por digestión de la pérdida de la diana XhoI y posterior secuenciación (Figura 12D).

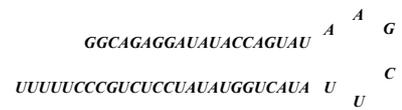
A



B



C



D

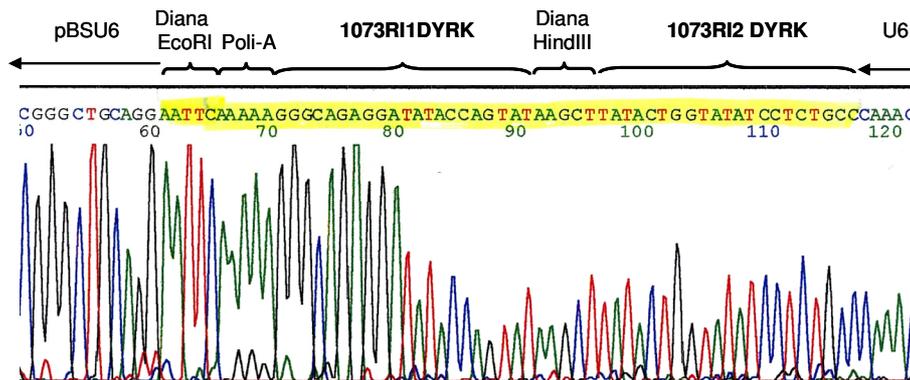


Fig. 12: Esquema mostrando los distintos pasos de la generación del plásmido inhibidor pBSU6. A): Esquema mostrando el diseño del inserto compuesto por un oligonucleótido (*sense*) que contiene la secuencia oligonucleotídica de 21 pb 1073RI DYRK (subrayada) y su complementario (*antisense*). **B):** Esquema del clonaje del inserto en el plásmido pBSU6. **C):** Esquema del transcrito de RNA correspondiente a 1073RI DYRK en conformación *hairpin*. **D):** Secuencia del inserto una vez clonado en el plásmido pBSU6

1.1. Validación de shDyrk1A como inhibidor del gen DYRK1A

A continuación se procedió a evaluar la capacidad del plásmido pU6shDyrk1A de inhibir la expresión del gen DYRK1A en distintos experimentos de transfección celular.

1.1.1. Inhibición de la expresión ectópica de DYRK1A

Se cotransfectaron células COS-7 con el plásmido de expresión que contenía la fusión GFP-DYRK1A (humano) y el plásmido vacío pBSU6 o células COS-7 con el plásmido GFP-DYRK1A y el plásmido inhibidor pU6shDyrk1A. Se testaron dos ratios distintas de GFP-DYRK1A : pU6shDyrk1A (1:1 y 1:2). El análisis inmunocitoquímico de la expresión de GFP-DYRK1A, 48 h después de la cotransfección, reveló una disminución en la señal de fluorescencia en las células cotransfectadas con el plásmido pU6shDyrk1A. La inhibición fue similar para las dos ratios utilizadas, indicativo de que shDyrk1A estaba inhibiendo la expresión del gen GFP/DYRK1A (Fig. 13).

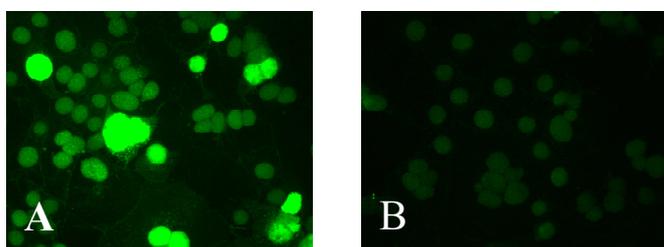


Fig. 13: Detección por inmunofluorescencia de la inhibición de Dyrk1A. Análisis por inmunocitoquímica de la inhibición de Dyrk1A fusionado a GFP utilizando el anticuerpo anti-GFP en células COS-7 transfectadas con (A) pBSU6 + GFP-DYRK1A, (B) pU6shDyrk1A + GFP-DYRK1A. (Ratio 1:1, en las fotos). En todos los casos se sembraron 300.000 células por placa de 60 mm 24 h antes de la cotransfección. Las imágenes fueron tomadas 48 h después de la cotransfección con una magnificación de 200x.

Para determinar la especificidad de la inhibición se realizaron dos experimentos distintos. En uno se cotransfectaron células COS-7 con los plásmidos GFP-DYRK1A, el plásmido inhibidor pU6shDyrk1A y un tercer plásmido HA-DSCR1 que contenía un gen no relacionado, DSCR1, fusionado al epítipo hemaglutinina (HA). El análisis por WB demostró que el shDyrk1A inhibía la expresión de GFP-DYRK1A y no la del gen HA-DSCR1 (Fig. 14).

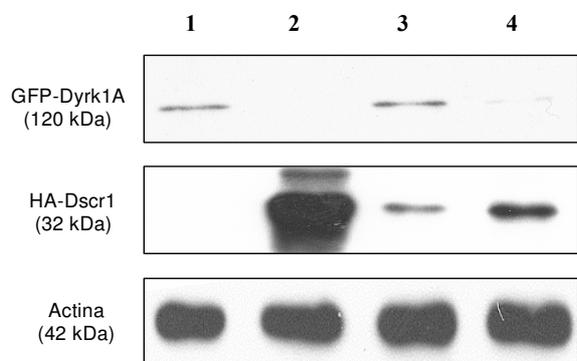


Fig. 14: Inhibición específica de Dyrk1A ectópico (I). Western Blot de extractos proteicos procedentes de cotransfecciones de COS-7 (lisis y extracto 48h después de cotransfectar). Se plaquearon 300.000 células por placa de 60 mm el día antes. La carga se realizó con 25 µg de proteína por muestra y se resolvió en un gel al 8 % de acrilamida. La membrana de nitrocelulosa se hibridó con el anticuerpo policlonal anti-GFP y el monoclonal anti-HA. Se utilizó la actina como control de carga usándose el anticuerpo policlonal anti-Actina. Se muestra una imagen representativa del WB. 1) pBSU6/GFP-DYRK1A; 2) pBSU6/HA-DSCR1, 3) pBSU6/GFP-DYRK1A/HA-DSCR1; 4) pU6shDyrk1A/GFP-DYRK1A/HA-DSCR1.

En el segundo experimento, se cotransfectaron células COS-7 con los plásmidos GFP-DYRK1A, el plásmido inhibidor pU6shDyrk1A y un tercer plásmido que contenía la fusión GFP-DYRKNH. Se testaron dos ratios distintas de pU6shDyrk1A : GFP-DYRKNH (1:1 y 2:1). Esta construcción codifica para una forma truncada del gen DYRK1A y carece de la secuencia diana para el hairpin (Fig. 15A). El análisis por WB reveló una disminución en la expresión de GFP-DYRK1A y no en la expresión de GFP-DYRKNH, confirmando la especificidad del shDyrk1A para la secuencia escogida (Figura 15B).

A



B

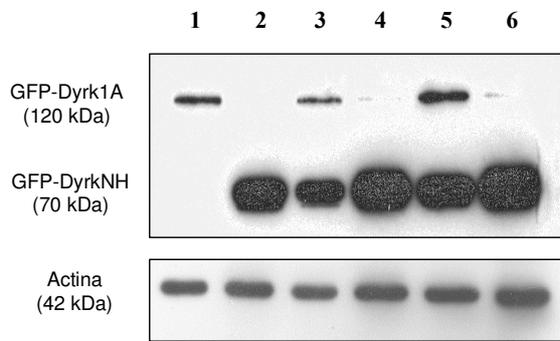


Fig. 15: Inhibición específica de Dyrk1A ectópico (II). A): Esquema de las construcciones GFP-DYRK1A y DYRKNH B): Western Blot a partir de extractos proteicos de cotransfecciones de células COS-7. La lisis celular y el extracto proteico se realizaron 48 horas después de cotransfectar. Se plaquearon 300.000 células por placa de 60mm el día anterior. La carga se realizó con 25 μ g de proteína por muestra y se resolvió en un gel al 8 % de acrilamida. La membrana de nitrocelulosa se hibridó con el anticuerpo policlonal anti-GFP. Se utilizó la actina como control de carga usándose el anticuerpo policlonal anti-Actina. Se muestra una imagen representativa del WB. 1, pBSU6/GFP-DYRK1A; 2, pBSU6/DYRKNH; 3, pBSU6/GFPDYRK1A/GFPDYRKNH; 4, pU6shDyrk1A/GFP-DYRK1A/GFP-DYRKNH; 5, pBSU6/GFP-DYRK1A/GFP-DYRKNH (2/1/1); 6, pU6shDyrk1A/GFP-DYRK1A/GFP-DYRKNH (2/1/1).

1.1.2. Inhibición de la expresión de DYRK1A endógeno

Para comprobar que el *hairpin* shDyrk1A inhibía la expresión del gen DYRK1A endógeno, se realizaron experimentos de transfección transitoria sobre células HEK293T. Se transfectaron células HEK293T con el plásmido vacío pBSU6 o con distintas cantidades (3 μ g y 6 μ g) del plásmido inhibidor pU6shDyrk1A. Mediante análisis por WB utilizando el anticuerpo primario anti-DYRK1A se pudo detectar una inhibición de alrededor de un 40% de la proteína DYRK1A endógena en aquellas células transfectadas con pU6shDyrk1A. El efecto observado fue independiente de la cantidad de DNA transfectada (Fig. 16).

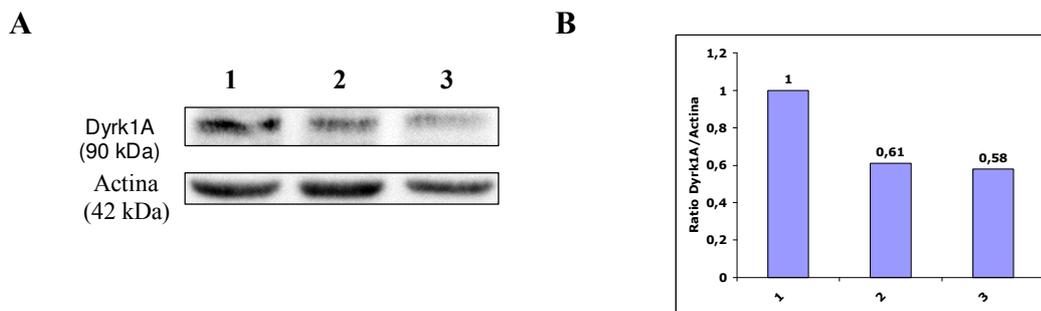


Fig 16: Inhibición de la expresión de DYRK1A endógeno. A): WB a partir de extractos proteicos de transfecciones de células 293T. La lisis celular y el extracto proteico se realizaron 48 horas después de cotransfectar. Se plaquearon 1×10^6 células por placa de 60mm el día anterior. La carga se realizó con 25 µg de proteína por muestra y se resolvió en un gel al 8 % de acrilamida. La membrana de nitrocelulosa se hibridó con el anticuerpo policlonal anti-Dyrk1A. Se utilizó la actina como control de carga usando el anticuerpo policlonal anti-Actina. 1) pBSU6, 2) pU6shDyrk1A (3µg), 3) pU6shDyrk1A (6µg). **B):** Cuantificación mediante densitometría de bandas de los resultados obtenidos en el WB. Los resultados se expresan como niveles relativos de proteína de Dyrk1A/Actina. 1) BSU6, 2) pU6shDyrk1A (3µg), 3) pU6shDyrk1A (6µg)

1.2. Validación de AAV-shDyrk1A como inhibidor del gen DYRK1A *in vitro*

1.2.1. Generación de dos vectores virales adenoasociados: AAV-shDyrk1A y AAV-scDyrk1A

A continuación se procedió a generar un vector viral adenoasociado que contuviera el constructo inhibidor y que permitiera un efecto a largo término de la inhibición de Dyrk1A y su aplicación *in vivo*. Se eligió el virus adenoasociado (AAV) debido principalmente a su probado tropismo neuronal, a su baja inmunogeneicidad y a la expresión duradera del transgén que se puede conseguir. El serotipo utilizado en este trabajo ha sido del tipo 2 (AAV-2) debido a que transduce eficientemente el núcleo estriado y dada la poca capacidad de transporte retrógrado que presenta dicho serotipo, lo que evita su difusión a otras áreas cerebrales (Burger et al., 2004).

En colaboración con el Dr. M. Chillón y la Dra. M. Monfar, de la Unidad de Producción de Vectores virales del Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (UPV-CBATEG) se generaron dos vectores virales. Un primer vector (AAV-shDyrk1A) diseñado para inhibir el gen Dyrk1A que contenía el constructo inhibidor shDyrk1A bajo el control del promotor U6; y un segundo vector (AAV-scDyrk1A) que contenía el mismo constructo pero con las bases reorganizadas al azar o "scrambled", también bajo el control del promotor U6. El hecho de disponer de la secuencia 1073RI DYRK desorganizada no permitiría el apareamiento con el mRNA de Dyrk1A y en consecuencia no induciría su inhibición, por lo que podría utilizarse como secuencia control. Ambos vectores contenían además, el gen reportero de la luciferasa bajo el control de un promotor constitutivo como era el del citomegalovirus (CMV). Para evitar posibles interferencias, los promotores se clonaron en orientación inversa (Fig. 17).

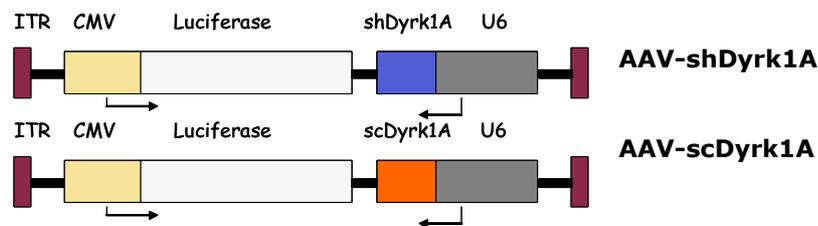


Fig. 17: Esquema de los virus generados: AAV-shDyrk1A y AAV-scDyrk1A. Ambos virus contienen el gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor CMV.

1.2.2. Evaluación de la eficiencia de transducción viral *in vitro*.

Se evaluó la capacidad de transducción de los vectores AAV-shDyrk1A y AAV-scDyrk1A mediante análisis de la actividad luciferasa en dos modelos celulares, en células HEK293 y en cultivos primarios neuronales derivados de corteza cerebelar (CGN). Se utilizaron distintas dosis virales (MOI) para la infección: 50, 100 y 500 MOI. Se observó actividad luciferasa en ambos cultivos tanto si habían sido transducidos con el virus AAV-shDyrk1A como con el AAV-scDyrk1A. Esta actividad incrementaba a medida que se aumentaba la dosis de infección, observándose un claro efecto dosis dependiente. También se detectó que a las mismas dosis, ambos virus mostraban una actividad luciferasa similar tanto en células HEK293 (Fig. 17B) como en CGN (Fig. 17C) lo que daba a entender que no existían diferencias importantes en la infectividad. La eficiencia de infección resultó ser mayor en los cultivos de HEK293 con unos valores de 10000 RLU a 500 MOI mientras que a la misma dosis, se observó unos valores de RLU de 3000 en CGNs.

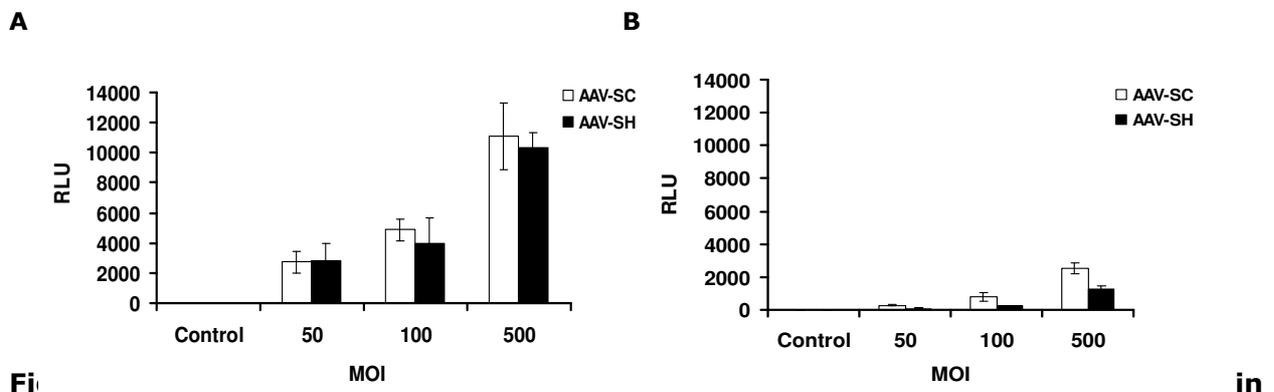


Fig. 17.2.2. Evaluación de la eficiencia de transducción viral *in vitro*: Cuantificación de la actividad luciferasa en los extractos celulares correspondientes a HEK293 (**B**) y CGNs (**C**), respectivamente. Se sembraron 1×10^3 células por pocillo de 96 en el caso de las HEK293 y 1.25×10^5 células en el caso de las CGN. 24h después se transdujeron a las MOI indicadas en la figura. La cuantificación se realizó 6 días post-infección. Los valores se estandarizaron respecto a los niveles de proteína. Los resultados se expresan en unidades de luz/ μ g proteína (RLU o LU/ μ g proteína) y se representan como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes.

1.2.3. Evaluación de la expresión de Dyrk1A tras infección con AAV-shDyrk1A y AAV-scDyrk1A *in vitro*.

A continuación, se analizaron los efectos de la transducción de AAV-shDyrk1A y AAV-scDyrk1A sobre la expresión de Dyrk1A tanto en cultivos de HEK293 como en CGNs. Se

infectaron las células HEK293 a distintas dosis virales (50, 100 y 500MOI) y a 500 MOI las CGNs. El análisis mediante WB mostró inhibición de Dyrk1A únicamente en las células infectadas con AAV-shDyrk1A y no en aquellas infectadas con AAV-scDyrk1A en ambos cultivos (Fig. 19A y B). La disminución en los niveles de Dyrk1A en células HEK293 infectadas con AAV-shDyrk1A fue dependiente de la dosis viral utilizada obteniéndose la mayor reducción a 500 MOI (Fig. 18A). Estos resultados demostraban que el virus AAV-shDyrk1A era capaz de reducir los niveles endógenos de Dyrk1A y no así el virus AAV-scDyrk1A.

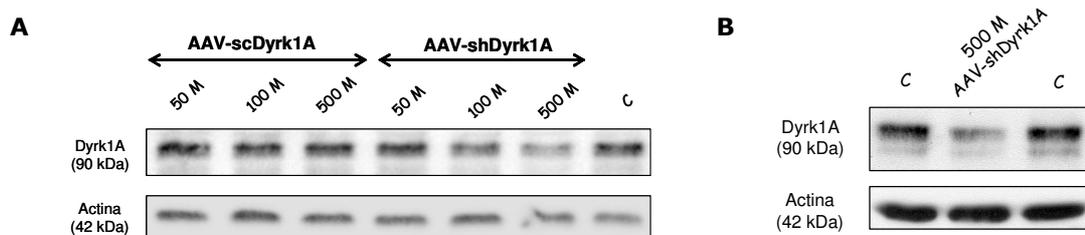


Fig. 19: Análisis de la expresión de Dyrk1A en cultivos infectados con AAV-shDyrk1A y AAV-scDyrk1A. Se sembraron placas de 12 pocillos con 1×10^4 células/pocillo (HEK293) y 4.5×10^5 células/pocillo (CGN) el día antes. La infección se realizó utilizando distintas dosis virales (50, 100 y 500 MOI) de los virus AAV-shDyrk1A y AAV-scDyrk1A durante 6 h (HEK293) o 24 h (CGN). La lisis de los cultivos y los extractos proteicos se realizaron 6 días post-infección. Inmunodetección mediante WB de la expresión de Dyrk1A tras infección de células HEK293 (A) o de CGN (B). En ambos modelos celulares, se cargaron 30 μ g de extracto proteico y se corrieron las muestras en un gel de acrilamida al 7.5%. Se hibridó la parte superior de la membrana de nitrocelulosa con anti-Dyrk1A y la parte inferior con anti-Actina.

1.3. Validación de AAV-shDyrk1A como inhibidor del gen DYRK1A *in vivo*

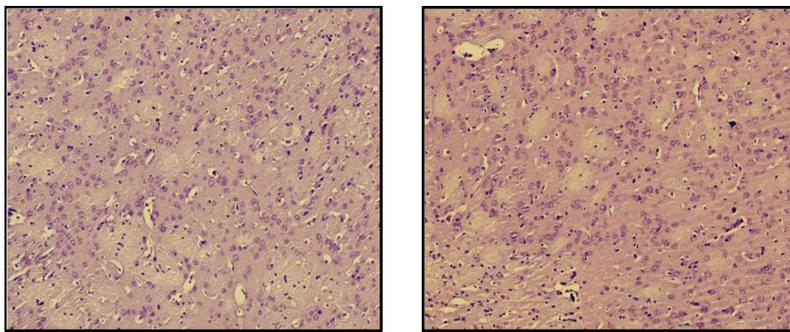
A continuación se estudiaron los efectos de AAV-shDyrk1A y AAV-scDyrk1A *in vivo* tras la administración viral directamente en el núcleo estriado del cerebro del ratón, mediante un procedimiento de estereotaxia. Se escogieron las coordenadas óptimas para la inyección basándonos en la descripción recogida en el atlas del cerebro del ratón (Paxinos & Franklin, ver ap. 5.3.1 de Mat. y Met.). Las coordenadas que se eligieron fueron + 0.7 mm en el eje antero-posterior, \pm 2 mm en el eje lateral y + 3 mm en el eje dorso-ventral, tomando *Bregma* como punto anatómico de referencia. Las inyecciones se realizaron en uno o en los dos hemisferios cerebrales según el experimento. En todos los casos, el volumen inyectado por hemisferio fue de 3 μ l y la velocidad de inyección de 200 nl/min. La inyección por hemisferio se realizó en dos tiempos, la mitad del volumen (1.5 μ l) se administró a 3 mm de profundidad y la mitad restante a 2.5 mm (ver ap. 5.3.2. de Mat. y Mét.). La dosis viral total inyectada por hemisferio fue de 1×10^9 gv para ambos virus.

1.3.1. Evaluación de la eficiencia y la especificidad de la transducción viral *in vivo* tras inyección intraestriatal de AAVs mediante procedimiento de estereotaxia

En primer lugar se comprobó si como consecuencia del procedimiento de inyección y de la infección viral, se producían lesiones en el tejido. Para ello se inyectaron 3 μ l del virus control AAV-scDyrk1A en el núcleo estriado de uno de los hemisferios mientras que el hemisferio contralateral fue inyectado con suero salino. Pasados 15 días, los animales fueron sacrificados y los cerebros procesados en parafina y cortados mediante microtomo (ap. 3.2.5.1. de Mat. y Mét.). Se seleccionaron varios cortes correspondientes al sitio de inyección y se realizó una tinción violeta de cresilo en todos ellos para analizar la citoarquitectura de la zona inyectada. El análisis microscópico reveló ausencia de daño celular o alteraciones morfológicas en los hemisferios inyectados, bien con suero salino o con el virus AAV-scDyrk1A (Fig. 20)

A

B



inyectado con AAV-scDyrk1A **(B)**. Ampliación realizada a 200x. (n=3).

Fig. 20: Análisis histológico del área de inyección mediante tinción con violeta de cresilo. En las imágenes se muestra un campo representativo del núcleo estriado del hemisferio inyectado con suero salino **(A)** y otro del hemisferio

Posteriormente, se realizaron un conjunto de experimentos dirigidos a valorar la eficiencia y especificidad de la transducción tras la administración de AAV-shDyrk1A y/o AAV-scDyrk1A en el núcleo estriado. Aprovechamos que ambos AAVs contenían el gen reportero de la luciferasa y utilizamos la expresión de ésta como indicador de transducción usando diferentes metodologías. Dos grupos de animales control fueron inyectados, uno de ellos con el virus AAV-shDyrk1A y el otro con el virus AAV-scDyrk1A. Las inyecciones se realizaron de forma bilateral en el núcleo estriado utilizando las coordenadas y las condiciones mencionadas anteriormente. Pasados 14 días después de la infección, se analizó la presencia y en su caso, el origen de la fuente de luz emitida en los animales inyectados. La detección de bioluminiscencia en el animal vivo se realizó mediante el uso de un sistema de imagen molecular óptica in vivo IVIS50 (Xenogen). En todos los animales se observó presencia de luz procedente de ambos hemisferios y representada por halos de color tal y como muestran las imágenes de pseudocolor tomadas por la cámara (Fig.21A a). Dichas imágenes se hallaban superpuestas a las imágenes en blanco y negro de los animales, lo que nos permitía comprobar in situ la localización del área inyectada. Estos datos demostraban la capacidad de los virus generados de transducir in vivo y expresar luciferasa. El análisis de los resultados mostró que la luz detectada provenía

ecíficamente de la zona de inyección. Para obtener mayor indicación sobre el área concreta de transducción, dos animales de cada grupo fueron sacrificados 14 días postinfección y se extrajo su cerebro que se analizó mediante el mismo procedimiento. La bioluminiscencia detectada nos confirmó que la actividad luciferasa se hallaba bien focalizada en los puntos de inyección (Fig. 21Ab). En cortes coronales y seriados de 1mm de grosor, se observó que el punto máximo de bioluminiscencia se hallaba localizado en la zona correspondiente al núcleo estriado y que se extendía unos 2 mm en el eje rostro-caudal (Fig.21Ac). A fin de poder confirmar que el área de expresión de luciferasa provenía del núcleo estriado, se realizó un análisis inmunohistoquímico de detección de luciferasa en secciones cerebrales en flotación. El análisis se realizó en animales que habían recibido AAV-scDyrk1A en uno de los hemisferios y suero salino en el hemisferio contralateral. Los resultados, a los 14 días postinfección revelaron la existencia de inmunorreactividad únicamente en el núcleo estriado correspondiente al hemisferio inyectado con AAV-scDyrk1A mientras que no se observó señal en el núcleo estriado del hemisferio contralateral inyectado con salino (Fig. 21 B).

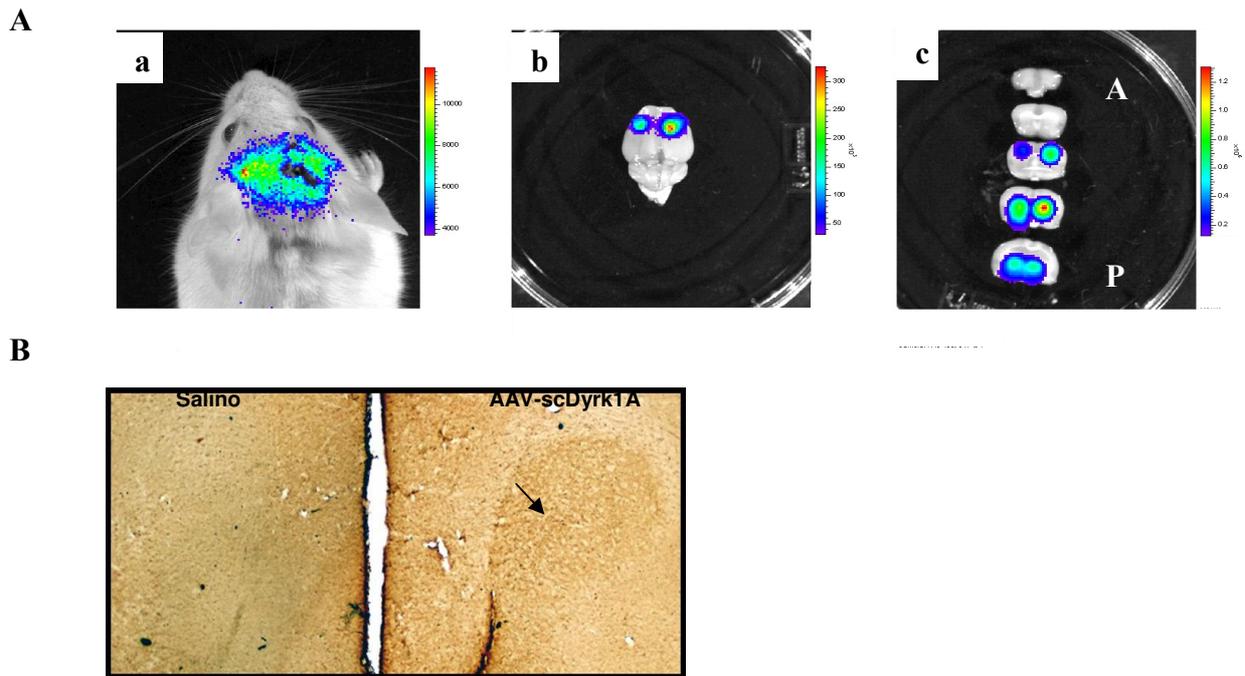


Fig. 21: Evaluación de la especificidad y la eficiencia de transducción tras administración de AAVs en el núcleo estriado mediante análisis de la expresión de luciferasa. Los animales fueron inyectados mediante estereotaxia en el núcleo estriado de ambos hemisferios. A un grupo de animales les fue administrado 3 μ l de AAV-scDyrk1A o AAV-shDyrk1A en ambos hemisferios (A) mientras que a un segundo grupo se les administró 3 μ l de suero salino en el hemisferio izquierdo y 3 μ l de AAV-scDyrk1A en el derecho (B). **A):** Imágenes representativas de la emisión bioluminiscente. Análisis de la expresión de luciferasa in vivo usando la técnica del *In Vivo Optical Imaging* sobre el animal inyectado, (n=4) (a) o sobre un cerebro aislado (n=2) (b) y cortado en secciones de 1mm con el *chopper* (n=2) (c). Se determinó la bioluminiscencia en el animal anestesiado a día 14 post-inyección viral, después de administrar 16 mg/Kg de D-luciferina. Las imágenes se adquirieron manteniendo siempre los mismos parámetros de sensibilidad pero a distintos tiempos de exposición: 10 min (a y b) y 5 min (c). Se representan codificadas por colores donde el rojo indica la máxima emisión de luz y el azul la mínima emisión de luz. Unidades expresadas en fotones. **B):** Detección de la expresión de luciferasa mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo policlonal anti-Luciferasa. Imagen representativa de una sección cercana al punto de inyección. La flecha señala la inmunorreactividad presente en el núcleo estriado inyectado con AAV-scDyrk1A. Imagen tomada con ampliación de 100X. (n=2).

Si bien los resultados obtenidos hasta el momento parecían indicar que la expresión de luciferasa se localizaba fundamentalmente en el núcleo estriado, no podíamos descartar que otras regiones del cerebro también se hubieran visto afectadas por la infección con los AAVs. Para contestar esta cuestión diseñamos unos experimentos en los que se inyectaron 3 μ l del virus control AAV-scDyrk1A en los dos hemisferios de los animales y a los 20 días post-infección se sacrificaron y se obtuvieron los extractos proteicos de córtex, cerebelo y las otras estructuras, además del núcleo estriado. La cuantificación de actividad luciferasa se realizó utilizando un luminómetro de tubo (ver ap. 3.3. de Mat. y Mét.). Los resultados mostraron niveles despreciables de actividad luciferasa en córtex, cerebelo y el resto del cerebro, mientras que en el núcleo estriado era de 15000 RLUs. (Fig. 22).

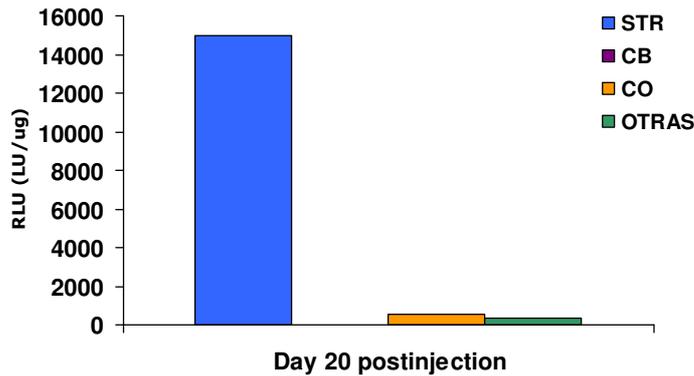


Fig. 22: Evaluación de la especificidad tras administración de AAVs en el núcleo estriado mediante análisis de la expresión de luciferasa en distintas estructuras cerebrales. Los animales fueron inyectados mediante estereotaxia en el núcleo estriado con 3 μ l de suero salino en el hemisferio izquierdo y 3 μ l de AAV-scDyrk1A en el derecho. Cuantificación de la actividad luciferasa a partir de extractos proteicos de distintas estructuras cerebrales de animales sacrificados 20 días post-inyección (STR: núcleo estriado; CB: cerebelo; CO: córtex). Los resultados se expresan en unidades de luz/ μ g proteína (RLU o LU/ μ g proteína).

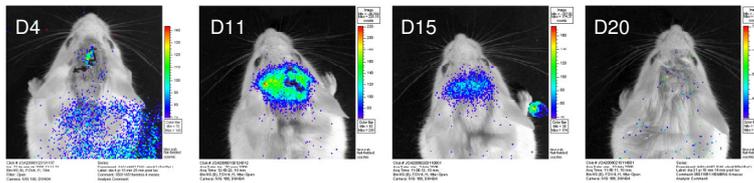
El conjunto de estos resultados indicaba que la administración de AAVshDyrk1A o de AAV-scDyrk1A en el núcleo estriado mediante el procedimiento de estereotaxia se restringía al área de inyección y ponía de manifiesto la casi nula existencia de transporte retrógrado del adenoasociado de serotipo 2 al hemisferio contralateral a través de la comisura, o a otras estructuras tal y como ya ha sido descrito (Burger et al., 2004).

1.1.1. Evaluación de la persistencia de la expresión tras administración intrastriatal de AAV-shDyrk1A

Otro aspecto fundamental a estudiar fue el análisis de la expresión de la luciferasa en los animales que habían recibido AAV-shDyrk1A a lo largo del tiempo. Un grupo de animales fue inyectado con 3 μ l del virus control AAV-scDyrk1A en el núcleo estriado de los dos hemisferios y se monitorizó la expresión de luciferasa por bioluminiscencia en cada animal a lo largo del tiempo. Se observó un pico de expresión de luciferasa entre los días 11 y 15 post-infección (Fig. 23A), y se detectó actividad hasta los 20 días después de la intervención. A partir de este punto, la sensibilidad de la técnica no permitía detectar actividad luciferasa. Para ello se realizó un experimento en paralelo y a distintos tiempos post-infección (Día 11, D20, D30, D40, D60, D90, D120) en los que se sacrificaban los ratones, se extraía el núcleo estriado y se cuantificaba la actividad luciferasa en los extractos proteicos. Se observó un pico de expresión de luciferasa entre los días 11 y 20 post-inyección (Fig. 21B), acorde con los resultados obtenidos con la técnica anterior. Entre los 30 y 60 días, se continuaba detectando importante actividad luciferasa

que decaía a tiempos más largos, si bien se detectó hasta pasados los 4 meses de la inyección viral, tiempo máximo al que llegó el estudio.

A



B

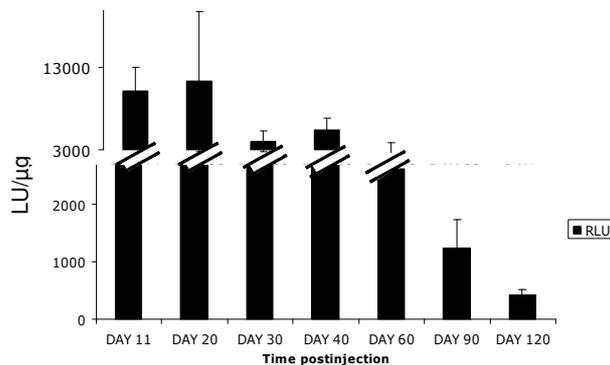


Fig. 23: Análisis del curso temporal de la actividad luciferasa tras administración de AAV-shDyrk1A. Se inyectó un grupo de animales con 3 μ l de AAV-scDyrk1A en cada hemisferio y se analizó la actividad de la luciferasa. Se utilizaron dos técnicas diferentes: **A)** Detección de la bioluminiscencia en el animal vivo mediante *Optical In Vivo Imaging* a distintos días post-inyección (4, 11, 15 y 20 días) después de administrar una dosis i.p. de 16 mg/Kg de D-Luciferina. Imágenes representativas de uno de los ratones inyectados. **B)** Cuantificación de la actividad luciferasa a partir de extractos de núcleos estriados. Los animales se sacrificaron a distintos días post-inyección. Los resultados se expresan en RLU (LU/ μ g de proteína) y se representan como promedios \pm SEM, n=4.

1.1.2. Estudio del curso temporal de la inhibición de Dyrk1A tras administración intraestriatal de AAV-shDyrk1A

A continuación procedimos a estudiar los efectos de la administración intraestriatal de AAV-shDyrk1A sobre la expresión de Dyrk1A a lo largo del tiempo. Este estudio se realizó en el modelo TgDyrk1A que sobreexpresa el gen Dyrk1A.

Ratones TgDyrk1A fueron inyectados con 3 μ l del virus control AAV-scDyrk1A en un hemisferio y 3 μ l del virus inhibidor AAV-shDyrk1A en el hemisferio contralateral. Pasados 1, 2, 3 o 4 meses post-inyección, se sacrificaron los animales, se extrajo el núcleo estriado correspondiente a cada uno de los hemisferios y se obtuvieron los extractos proteicos donde se determinaron los niveles proteicos de Dyrk1A mediante WB (Fig. 24 A). Los resultados mostraron que a todos los tiempos analizados existía una inhibición de la expresión de Dyrk1A en los hemisferios inyectados con el virus AAV-shDyrk1A con respecto a sus respectivos hemisferios contralaterales, inyectados con el virus control AAV-scDyrk1A. Esta inhibición se estimó entre un 20 y un 50% dependiendo del animal (Fig. 24B).

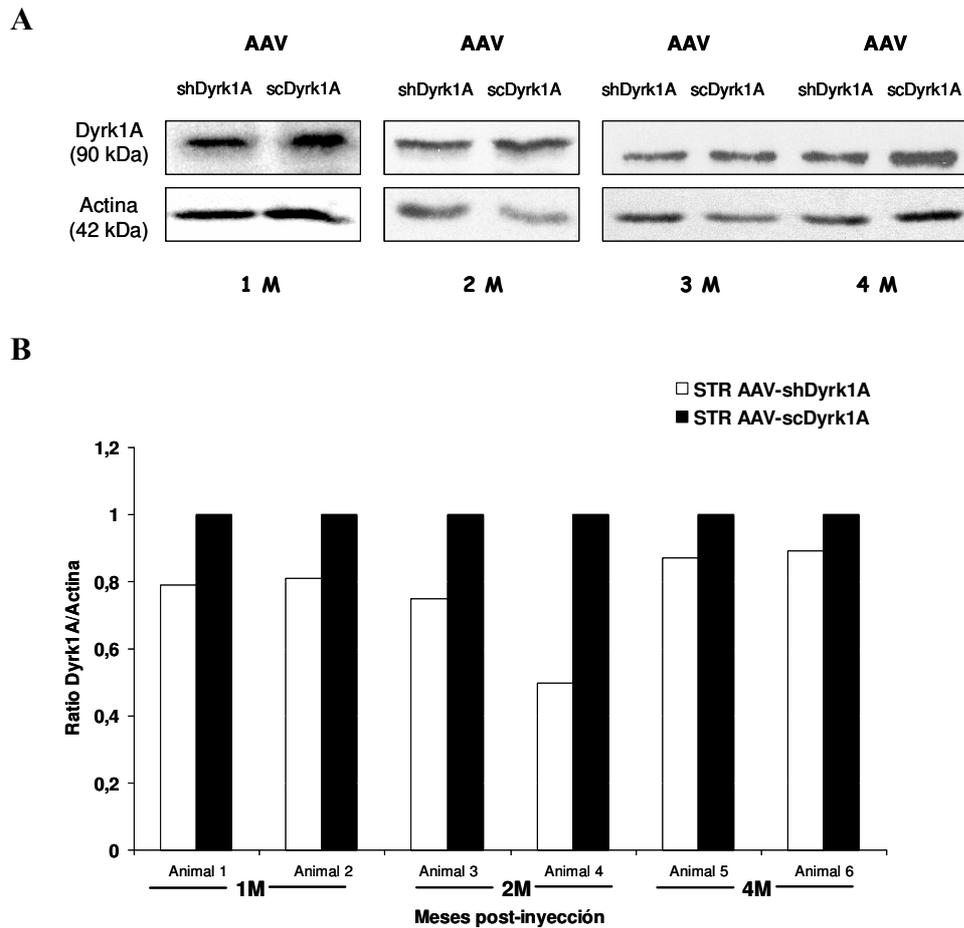


Fig. 24: Estudio de la expresión de Dyrk1A in vivo a distintos tiempos tras administración viral en el núcleo estriado. Se inyectaron 8 animales con 3 μ l de AAV-shDyrk1A en un hemisferio y con 3 μ l de AAV-scDyrk1A en el hemisferio contralateral y fueron sacrificados a distintos tiempos post-inyección (1, 2, 3 y 4 meses) a razón de 2 animales por punto estudiado. **A):** Análisis mediante WB de los niveles proteicos de Dyrk1A a los distintos tiempos. Se muestran los resultados correspondientes a 1 animal por punto. Se cargaron 80 μ g de proteína por muestra y fueron resueltos en un gel al 7.5% de acrilamida. La membrana de nitrocelulosa fue hibridada con el anticuerpo policlonal anti-Dyrk1A. Se utilizó la actina como control de carga usando para su detección el anticuerpo policlonal anti-Actina. **B):** Cuantificación mediante densitometría de bandas de los resultados obtenidos en el WB correspondientes a todos los animales. Los resultados se expresan como niveles relativos de proteína de Dyrk1A/Actina.

Para determinar la magnitud de la reducción de Dyrk1A en TgDyrk1A en relación con los valores basales de animales control, se diseñó un nuevo experimento. Ratones TgDyrk1A recibieron bien AAV-shDyrk1A (grupo 1), bien AAV-scDyrk1A (grupo 2) mediante inyección en el núcleo estriado. Un grupo de ratones control (grupo 3) recibió únicamente solución salina. Los animales se mantuvieron 8 meses al final de los cuales fueron sacrificados. El análisis mediante WB de la expresión de Dyrk1A de los extractos proteicos obtenidos a partir de los estriados inyectados mostró una reducción de la sobreexpresión de Dyrk1A en los ratones TgDyrk1A inyectados con AAV-shDyrk1A al comparar con aquellos inyectados con el virus control AAV-scDyrk1A. La reducción de los niveles proteicos de Dyrk1A obtenida era similar a la expresión endógena de Dyrk1A en los animales control inyectados con salino (Fig. 25).

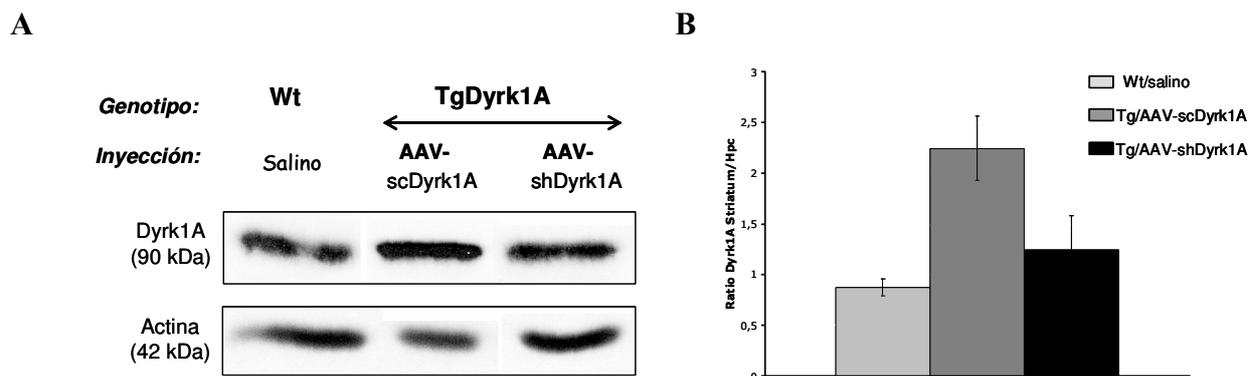


Fig. 25: Estudio a largo plazo de la inhibición de Dyrk1A in vivo tras administración viral en el núcleo estriado. Se inyectaron varios grupos de animales con distintos tratamientos (grupo/tratamiento): TgDyrk1A/AAV-shDyrk1A, TgDyrk1A /AAV-scDyrk1A, controles/salino. La inyección se realizó de forma bilateral en ambos hemisferios siendo el volumen inyectado de 3 μ l/hemisferio. Los animales se sacrificaron 8 meses después de la inyección **A)**: Análisis mediante WB de los niveles proteicos de Dyrk1A. Se muestra una imagen representativa con los resultados correspondientes a 1 animal de cada grupo. Se cargaron 80 μ g de proteína por muestra y fueron resueltos en un gel al 7.5% de acrilamida. La membrana de nitrocelulosa fue hibridada con el anticuerpo policlonal anti-Dyrk1A. Se utilizó la actina como control de carga usando para su detección el anticuerpo policlonal anti-Actina. **B)**: Cuantificación mediante densitometría de bandas de los resultados obtenidos en el WB. Los resultados se representan como la media \pm SEM, n=4.

El conjunto de estos resultados demostró que la inyección de AAV-shDyrk1A en el núcleo estriado de TgDyrk1A provocaba una reducción en los niveles de Dyrk1A observando niveles similares a los de los animales control. Este efecto se detectó hasta al menos 8 meses post-inyección.

3.5. Estudio de los efectos en el fenotipo motor del modelo murino TgDyrk1A tras administración intraestriatal de AAV-shDyrk1A y su repercusión sobre la expresión de las subunidades del receptor NMDA. Validación de Dyrk1A como diana terapéutica.

Como ya hemos descrito anteriormente, el modelo transgénico TgDyrk1A presenta claras alteraciones en varios procesos motores. El núcleo estriado participa en el control de procesos motores, en concreto en la iniciación y control del movimiento tanto voluntario como automático (Nakano et al., 2000; Groenewegen, 2003; Grillner et al., 2005) por lo que nos propusimos estudiar si la inhibición de Dyrk1A mediante la inyección estriatal de AAV-shDyrk1A sería capaz de corregir el fenotipo motor de TgDyrk1A.

3.5.1. Estudio de las consecuencias en las alteraciones motoras presentes en el modelo TgDyrk1A tras administración viral de AAV-shDyrk1A en el núcleo estriado

Se distribuyeron a los animales en 4 grupos. Un grupo de ratones control a los que se administró suero salino y tres grupos de ratones transgénicos: un primer grupo que recibió suero salino, un

segundo grupo tratado con el virus AAV-shDyrk1A, y un tercer grupo inyectado con el virus control AAV-scDyrk1A. Se utilizó el procedimiento de estereotaxia para la inyección intraestriatal que se realizó de forma bilateral (en ambos hemisferios) (ver ap. 5.3. de Mat. y Mét.). La cantidad de virus administrado por hemisferio fue de 1×10^9 partículas virales (pv) en un volumen de 3 μ l. En todos los experimentos los animales utilizados fueron machos que tenían entre 2 a 3 meses de edad en el momento de la intervención.

3.5.1.1. Hiperactividad. Test de actimetría.

Se randomizaron los animales en los 4 grupos de estudio (Wt/salino, TgDyrk1A/salino, TgDyrk1A/AAV-shDyrk1A y TgDyrk1A/AAV-scDyrk1A) y se realizó el test en todos ellos (ver esquema Fig. 29A) 1 semana antes de la administración del tratamiento (IR PREOP). Tal y como habíamos visto anteriormente se observó la hiperactividad de los animales transgénicos TgDyrk1A (ANOVA, $*p=0.031$) (Fig. 29B). A los dos meses después de la intervención, se volvió a aplicar el test observándose que la hiperactividad se mantenía en los grupos de animales transgénicos inyectados con salino o con el virus control AAV-scDyrk1A mientras que el grupo que recibió el virus AAV-shDyrk1A presentaba reducida su actividad, observándose diferencias significativas al comparar los grupos de animales transgénicos inyectados con salino y AAV-shDyrk1A (ANOVA, $*p=0.05$) (Fig. 29B). Se repitió el test a los 4 meses observando que el grupo de animales transgénicos inyectados con AAV-shDyrk1A presentaban niveles de actividad reducida respecto de los grupos transgénicos inyectados con salino (ANOVA, $*p=0.032$) o AAV-scDyrk1A (ANOVA, $**p=0.006$). Esta reducción de la actividad resultó significativa al comparar con los niveles presentados por el mismo grupo transgénico 1 semana antes del tratamiento con AAV-shDyrk1A (ANOVA, $*p=0.02$) observándose unos valores similares a los de los animales control (Fig. 29B).

Estos resultados mostraban pues que los animales TgDyrk1A inyectados con el virus AAV-shDyrk1A en el núcleo estriado presentaban una reducción en la hiperactividad alcanzando niveles similares a los de los animales control y que dicho efecto se mantenía como mínimo hasta los 4 meses post-inyección.

A



B

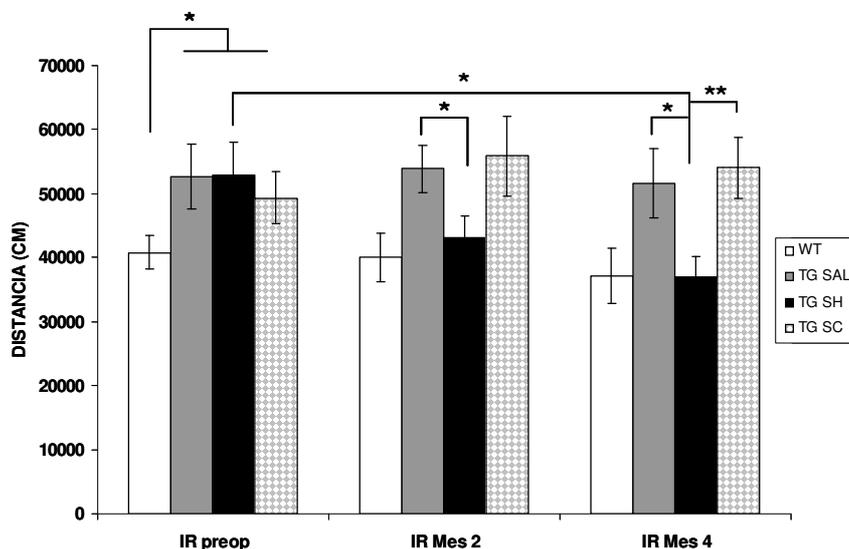


Fig.29: Análisis de la actividad horizontal en animales adultos TgDyrk1A tras administración intraestriatal de AAV-shDyrk1A. A) Esquema temporal de la aplicación del test antes y después de la operación mediante estereotaxia. B) Gráfico mostrandolos datos relativos a distancia total en cm recorrida en 24h. El test (IR, *infrared*) se realizó 1 semana antes de la inyección (IR preop) y a dos momentos post-inyección: a 2 y a 4 meses (IR Mes 2, IR Mes 4). Los animales se randomizaron en 4 grupos (tratamiento): Wt (salino) (n=14), TgDyrk1A (salino, n=14), TgDyrk1A (AAV-shDyrk1A, n=14), TgDyrk1A (AAV-scDyrk1A, n=14). La inyección se realizó mediante procedimiento estereotáxico en el núcleo estriado de forma bilateral. El volumen inyectado fue de 3 μ l/hemisferio y la cantidad de virus de 10^9 pv/hemisferio. Los datos se expresan en promedios \pm SEM. Diferencias entre tratamientos (ANOVA, * p <0.05, ** p <0.01).

3.5.1.2. Alteraciones en coordinación motora. Test de la cinta giratoria sinfín.

El test de la cinta giratoria sinfín se realizó con algunas variaciones en dos experimentos independientes. En el primero se aplicó el test en tres ocasiones: 2 semanas antes, 1 mes y 3 meses después de la operación. En el segundo, únicamente se realizó el experimento a los 4 meses de la intervención (ver esquema Fig.30A).

En el primer experimento, una vez randomizados los animales en los 4 grupos de estudio (Wt/salino, TgDyrk1A/salino, TgDyrk1A/AAV-shDyrk1A y TgDyrk1A/AAV-scDyrk1A), se realizó la prueba antes de la intervención (TM PREOP) utilizando condiciones estándar (ap. 2.5.1.2. Resultados). Los resultados volvieron a poner de manifiesto la existencia de alteraciones en coordinación motora de los animales TgDyrk1A observándose que los animales transgénicos recibían un mayor número de shocks comparado con los animales control, siendo las diferencias entre genotipos estadísticamente significativas (** p =0.002, ANOVA) (Fig. 30B). Al aplicar el

test 1 mes después de la operación utilizando las condiciones estándar, se observó cierto grado de habituación por parte de los animales, lo cual no permitió detectar diferencias entre genotipos. En vista de estos resultados, decidimos aumentar el nivel de dificultad del test (velocidad: 60 cm/s; pendiente: 40° de inclinación). Aplicando estas condiciones, se observó que los animales transgénicos inyectados con AAV-shDyrk1A recibían un menor número de shocks respecto a los otros grupos transgénicos inyectados bien con salino o con el virus control AAV-scDyrk1A. Estas diferencias resultaron ser significativas (* $p=0.032$; * $p=0.016$, ANOVA; comparando con el grupo TGSAL y TGSC respectivamente). Esta reducción en el número de shocks recibidos alcanzó unos valores similares a los detectados en los animales control (Fig. 30C). Cuando se volvió a someter a los animales al test 3 meses de la inyección, se utilizaron las condiciones estándar de nuevo y se observó un menor número de shocks recibidos por el grupo transgénico tratado con AAV-shDyrk1A con respecto a los otros grupos transgénicos inyectados bien con salino, o con AAV-scDyrk1A, alcanzando niveles similares a los del grupo control (Fig. 30 D).

En el segundo experimento, se realizó el test una vez, a los 4 meses de la intervención y se aplicaron las condiciones forzadas (60 cm/s; 40°) utilizadas en el anterior experimento. Se observó que los ratones transgénicos inyectados bien con salino, bien con AAV-scDyrk1A, recibían un alto número de shocks mientras que los animales transgénicos a los que se les había administrado el virus AAV-shDyrk1A recibieron un menor número de shocks (* $p=0.043$; * $p=0.033$, ANOVA; comparando con el grupo TGSAL y TGSC respectivamente) y que era similar al recibido por los animales control (Fig. 30D).

Todos estos resultados sugerían que la inhibición de la sobreexpresión de Dyrk1A en el núcleo estriado de los animales transgénicos llevaba consigo una mejoría en la coordinación motora de dichos animales. Este efecto de corrección motora se mantuvo hasta los 4 meses post-inyección que duró el estudio.

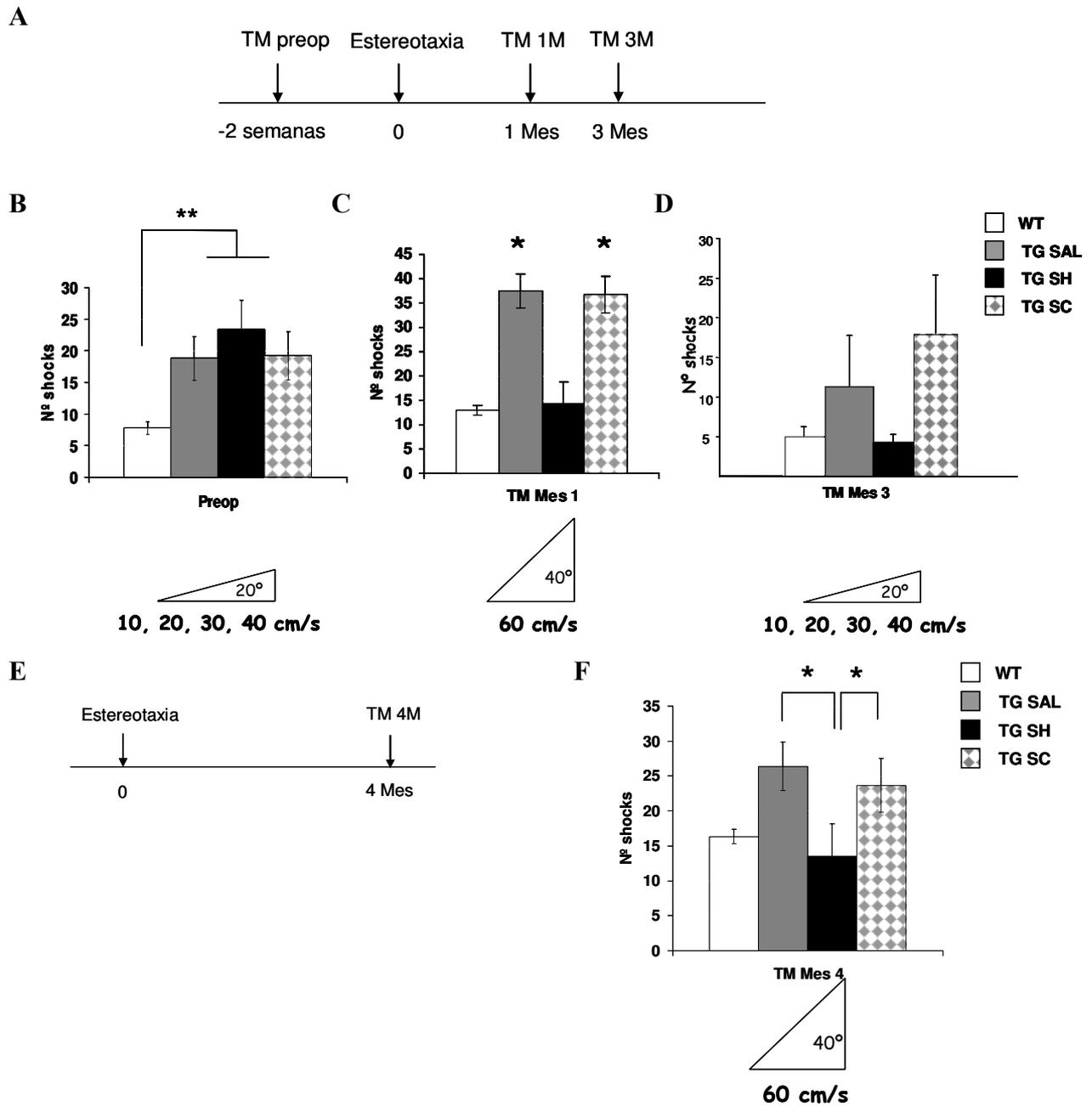


Fig. 30: Análisis de la coordinación motora en animales adultos TgDyrk1A tras administración intraestriatal de AAV-shDyrk1A. Test de la cinta giratoria sinfín. Se realizaron 2 experimentos independientes. Los animales se randomizaron en 4 grupos (tratamiento): Wt (salino), TgDyrk1A (salino, AAV-shDyrk1A, AAV-scDyrk1A). La inyección se realizó mediante procedimiento estereotáxico en el núcleo estriado de forma bilateral. El volumen inyectado fue de 3 μ l/hemisferio y la cantidad de virus de 10^9 pv/hemisferio. **A**) Esquema temporal del primer experimento. **B,C,D**): Datos correspondientes al primer experimento: antes de la operación (Preop) (**B**), 1 mes (TM Mes 1) (**C**) y 3 meses post-inyección (TM Mes 3) (**D**). Protocolo consistente en: 2 sesiones de aprendizaje (5cm/s; 0°) y 4 sesiones de dificultad creciente (10, 20, 30, 40 cm/s; 20°) (**B** y **D**); una sesión de aprendizaje (10cm/s; 40°) y una sesión en condiciones forzadas (60 cm/s; 40°) (**C**). Se muestran los datos relativos al número de shocks recibidos por cada grupo. (n=6/grupo). Los datos se expresan en promedios \pm SEM. Diferencias entre genotipos y/o tratamientos (**p<0.005, *p<0.05, ANOVA). **E**) Esquema temporal del segundo experimento. **F**) Datos correspondientes al segundo experimento y analizados 4 meses post-inyección (TM Mes 4). Protocolo consistente en una sesión de aprendizaje (10cm/s; 40°) y una sesión en condiciones forzadas (60 cm/s; 40°). Se muestran los datos relativos al número de shocks recibidos por cada grupo. (n=7/grupo). Los datos se expresan en promedios \pm SEM. Diferencias entre tratamientos (*p<0.05, ANOVA).

3.5.1.3. Alteraciones en la integración sensorimotora. Test del reflejo del sobresalto.

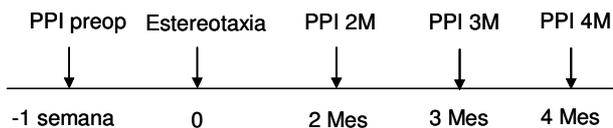
Los animales fueron randomizados en 4 grupos de estudio (Wt/salino, TgDyrk1A/salino, TgDyrk1A/AAV-shDyrk1A y TgDyrk1A/AAV-scDyrk1A) y sometidos al test en distintos momentos (ver esquema Fig. 31A): 1 semana antes de la administración del tratamiento (PPI PREOP) y pasados 2, 3 y 4 meses de la inyección (PPI 2M, PPI 3M, PPI 4M).

El primer test reveló la tendencia ya vista con anterioridad de los animales control a presentar un mayor porcentaje de inhibición mediado por prepulso respecto a los animales TgDyrk1A. Este efecto se observó a todas las intensidades de prepulso utilizadas, si bien las diferencias no llegaron a ser significativas en ninguno de los puntos (Fig. 31B, PREOP). Al repetir la prueba 2 meses después de la inyección, se observó una mejoría en la respuesta por parte del grupo transgénico inyectado con AAV-shDyrk1A llegando a presentar los valores más altos de inhibición. A intensidades bajas de prepulso, las diferencias eran estadísticamente significativas a 74 db (TG SH vs TG SC; * $p=0.03$, ANOVA), a 78 db (TG SH vs TG SC; ** $p=0.008$, ANOVA) y a 82 db (TG SH vs TG SC; * $p=0.044$, ANOVA) (Fig. 31B, 2M POSTOP). Las diferencias entre el resto de grupos no fueron significativas en ninguna de las intensidades analizadas (Fig. 31B, 2M POSTOP). Esta mejoría en la respuesta inhibitoria mediada por prepulso por parte del grupo transgénico tratado con el virus AAV-shDyrk1A se mantuvo, como mínimo, hasta los 4 meses de la intervención. En este punto, se observaron diferencias significativas con respecto al grupo transgénico que había recibido AAV-scDyrk1A a las intensidades de 74 y 86 db (* $p=0.035$, * $p=0.04$, ANOVA) (Fig. 31B, 4M POSTOP).

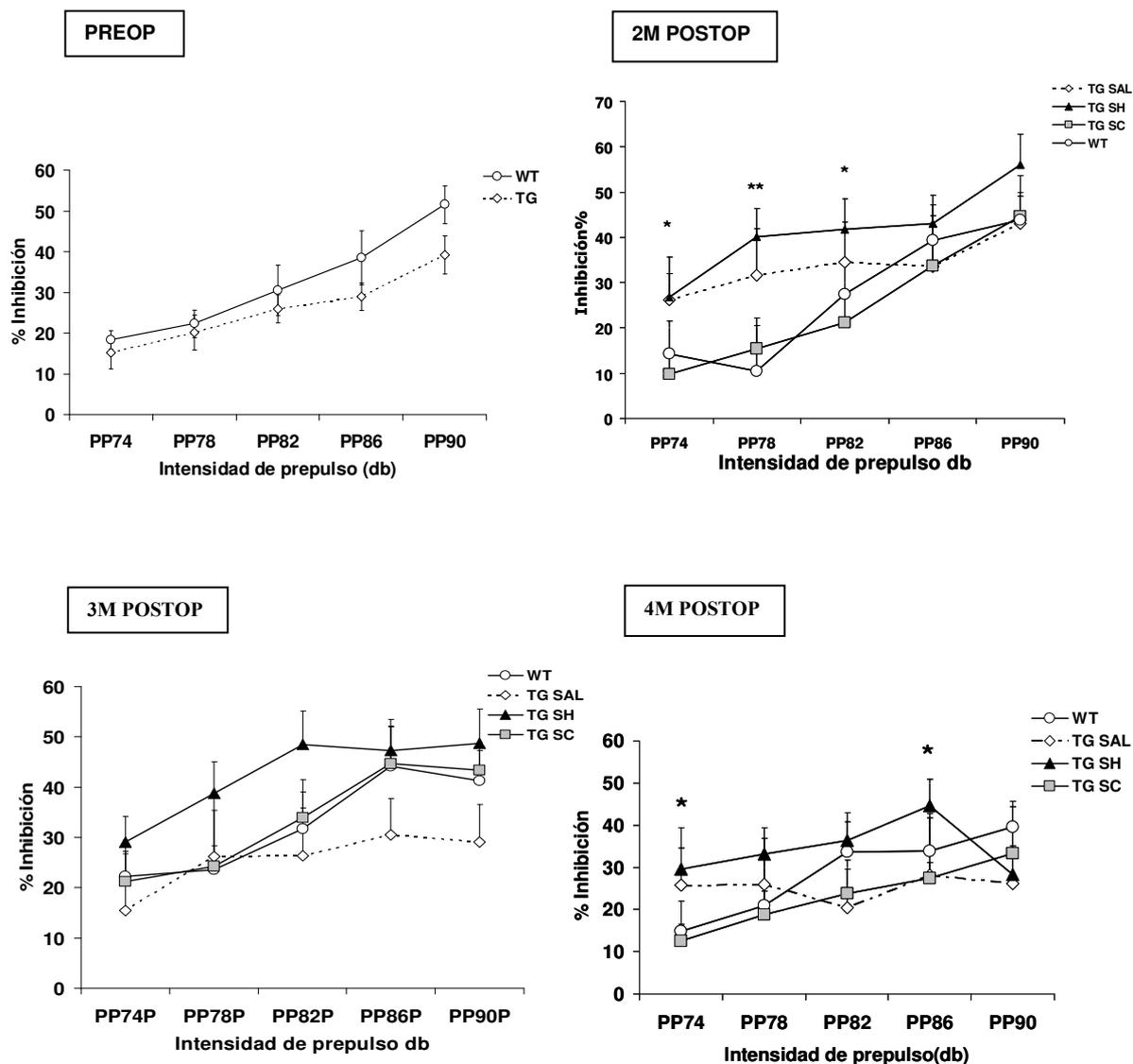
El estudio de la respuesta de cada uno de los grupos a lo largo del tiempo reveló que el único grupo que presentó algún cambio significativo en la realización de la prueba fue el grupo de animales transgénicos tratados con el virus AAV-shDyrk1A. Esta mejoría resultó significativa pasados 2 y 4 meses post-inyección cuando se aplicaba la intensidad de 78 db. (* $p=0.018$, * $p=0.042$, ANOVA) (Fig. 31C).

Estos resultados indicaban que la reducción de la expresión de Dyrk1A en el núcleo estriado del ratón TgDyrk1A conducía a una mayor respuesta inhibitoria mediada por un prepulso, indicativo de una mejoría en las vías de integración sensoriomotora.

A



B



C

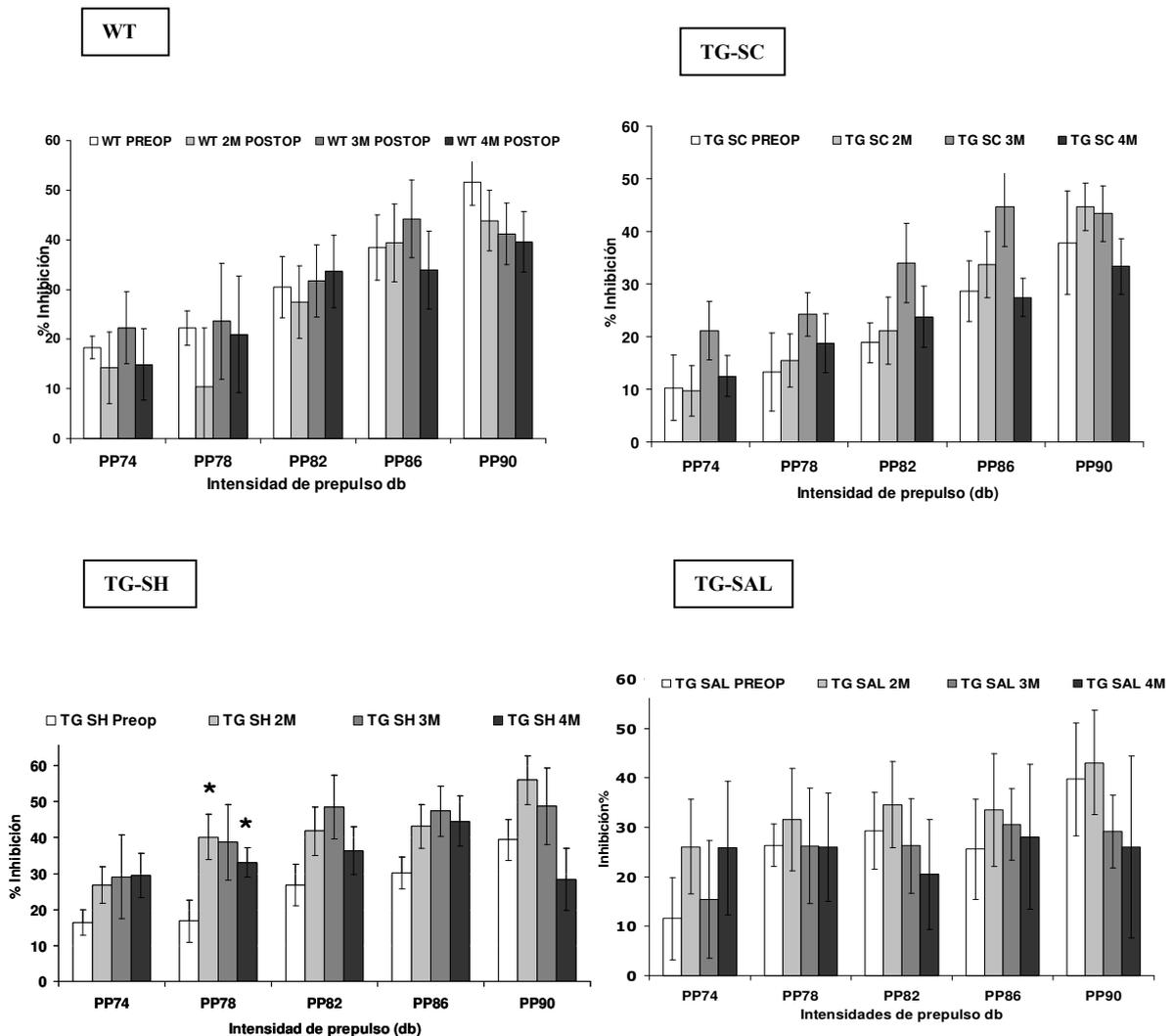


Fig.31: Análisis de la inhibición mediada por prepulso (PPI) en animales adultos TgDyrk1A tras administración intraestriatal de AAV-shDyrk1A. Test del reflejo del sobresalto. **A)** Esquema temporal de la aplicación del test. Los animales se randomizaron en 4 grupos (tratamiento): Wt (salino), TgDyrk1A (salino, AAV-shDyrk1A, AAV-scDyrk1A). La inyección se realizó mediante procedimiento estereotáxico en el núcleo estriado de forma bilateral. El volumen inyectado fue de 3 μ l/hemisferio y la cantidad de virus de 10^9 pv/hemisferio. Se muestran los datos relativos a la respuesta de sobresalto de los animales a un pulso mediada por la acción de un prepulso. Tanto el pulso como el prepulso son estímulos acústicos cuyas unidades vienen referidas en decibelios según su intensidad (db) (intensidad del pulso: 120 db; intensidades de prepulso: 74, 78, 82, 86, 90 db). **B):** Representación de los resultados comparando los distintos grupos tratados en cada uno de los tiempos de realización del test (PREOP: preoperatorio; 2M, 3M, 4M POSTOP: 2 meses, 3 meses, 4 meses post-operación). **C):** Representación de los resultados comparando cada uno de los grupos a lo largo del tiempo (WT: controles inyectados con salino; TG-SAL: TgDyrk1A inyectados con salino; TG-SH: TgDyrk1A inyectados con AAV-shDyrk1A; TG-SC: TgDyrk1A inyectados con AAV-scDyrk1A). Datos expresados como porcentajes de inhibición y se representan como promedios \pm SEM (PREOP: Wt: n=8, Tg: n=24; POSTOP: n=8/grupo). (* $p < 0.05$, ANOVA).

3.5.2. Estudio de la expresión de las subunidades del receptor NMDA de glutamato tras administración intraestriatal de AAV-shDyrk1A

En este trabajo hemos observado que los ratones TgDyrk1A presentan una desregulación en la expresión de las subunidades del receptor NMDA de glutamato en ciertas áreas responsables de procesos motores como son el cerebelo y el núcleo estriado. En base a ello decidimos estudiar si la inyección en el núcleo estriado del virus AAV-shDyrk1A podría afectar a la expresión de dichas subunidades. Se inyectaron animales con el virus AAV-shDyrk1A en el estriado de uno de los hemisferios y con el virus control AAV-scDyrk1A en el contralateral. Se analizó mediante WB la expresión de las subunidades NR2A y NR1 así como la expresión de Dyrk1A a distintos tiempos post-inyección: 3, 4 y 6 meses. Se observó de nuevo una reducción de la expresión de Dyrk1A en los hemisferios inyectados con el virus AAV-shDyrk1A y a todos los tiempos analizados (Fig. 32A). Se detectó también una reducción en los niveles proteicos de NR2A en dichos hemisferios en todos los tiempos (Fig. 32A). La expresión de la subunidad NR1 sólo fue analizada a los 6 meses post-inyección, observándose también una reducción en los hemisferios inyectados con AAV-shDyrk1A (Fig. 32A). Para descartar posibles efectos inespecíficos, se utilizó un marcador neuronal como era la sinaptofisina no observándose cambios en sus niveles proteicos en ninguno de los grupos de estudio.

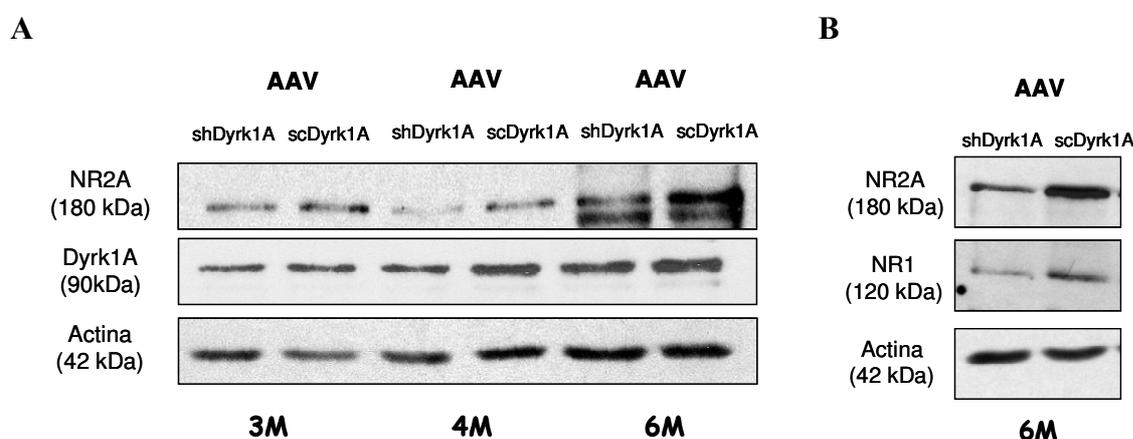


Fig. 32: Estudio de la expresión de las subunidades NR2A y NR1 del receptor NMDA de glutamato a distintos tiempos tras administración viral en el núcleo estriado. Se inyectaron 6 animales con 3 μ l de AAV-shDyrk1A en un hemisferio y con 3 μ l de AAV-scDyrk1A en el hemisferio contralateral y fueron sacrificados a distintos tiempos post-inyección (3, 4 y 6 meses) a razón de 2 animales por punto estudiado. **A**): Análisis mediante WB de los niveles proteicos de Dyrk1A y NR2A a los distintos tiempos post-inyección analizados. **B**): Análisis mediante WB de los niveles proteicos de NR2A y NR1 6 meses post-inyección. **A y B**): Se muestran los resultados correspondientes a 1 animal por punto. Se cargaron 80 μ g de proteína por muestra y fueron resueltos en un gel al 7.5% de acrilamida. Las membranas de nitrocelulosa fueron hibridadas con los anticuerpos policlonales anti-Dyrk1A, anti-NR1 y anti-NR2A. Se utilizó la actina como control de carga usando para su detección el anticuerpo policlonal anti-Actina.

Estos resultados indicaban que la expresión de las subunidades NR2A y NR1 del receptor NMDA de glutamato estaba modulada, de manera directa o indirecta, por Dyrk1A.

DISCUSION



DISCUSION

El síndrome de Down cursa con gran variedad de manifestaciones y presenta como alteración principal el retraso mental. Entender las alteraciones neurobiológicas subyacentes es una tarea complicada debido en parte, a la heterogeneidad fenotípica existente en los individuos con SD. El posible tratamiento de dichas alteraciones supone un reto para clínicos y científicos, aunque hay cada vez más evidencias para considerar el potencial del cerebro con SD para la intervención terapéutica en el futuro. Para ello es necesario profundizar en el estudio de la patogénesis del SD y determinar dianas a la hora de desarrollar estrategias terapéuticas.

El presente trabajo se ha centrado en validar al gen DYRK1A como diana terapéutica en un paradigma de sobreexpresión como es el modelo murino transgénico TgDyrk1A. Para ello se ha puesto a punto una estrategia para reducir in vivo la expresión de Dyrk1A de los ratones transgénicos TgDyrk1A y se han estudiado los efectos derivados de dicha reducción sobre el fenotipo motor en el animal adulto.

Desarrollo de una estrategia de terapia génica para reducir la expresión de Dyrk1A en el modelo TgDyrk1A

La estrategia utilizada para reducir de forma específica la expresión del gen se ha basado en un mecanismo conocido como RNA de interferencia (RNAi). Al inicio de este trabajo, éste se presentó como la herramienta más eficaz de silenciamiento génico frente a otras alternativas existentes como eran los ribozimas o los oligonucleótidos antisentido. Uno de los puntos importantes para el uso del RNAi es el diseño de la secuencia que ha de hibridarse con su mRNA diana evitando causar efectos inespecíficos, tales como unirse a otros mRNAs. Recientemente se ha descrito que el reconocimiento parcial de secuencias en las regiones 3'UTR de los mRNAs es suficiente para la unión de la secuencia inhibidora y la posterior activación de la vía de silenciamiento (Birmingham et al., 2006; Jackson et al., 2006). En el momento de empezar este trabajo, aún no se había descrito ningún efecto inespecífico asociado al RNAi así que se eligieron las secuencias diana y se generaron los distintos constructos siguiendo las directrices imperantes en aquel momento (Elbashir et al., 2001). Desde un principio, se decidió utilizar RNAs en conformación *hairpin* (shRNAs) lo que permitiría la aplicación de la técnica in vivo mediante el uso de un vector viral y conseguir así un silenciamiento estable y a largo plazo. El uso de AAVs permite conseguir una expresión del

transgén estable y a largo plazo. Además, presentan un tropismo neuronal y son poco inmunogénicos, lo cual los hace muy atractivos para su uso *in vivo*. El serotipo elegido fue el de tipo 2 (AAV-2) ya que era el mejor caracterizado y el más utilizado en ensayos en terapia génica con AAVs en aquel momento (Xu et al., 2001). Además, en varios estudios se había demostrado su eficiencia en la transducción del núcleo estriado (Tenenbaum et al., 2000; Hadaczek et al., 2004) con muy poca o nula capacidad de transporte retrógrado a otras áreas (Chamberlin et al., 1998; Wang et al., 2005) y con una persistencia de la expresión del transgén que podía llegar hasta los 18 meses post-inyección (Sondhi et al., 2005). Características todas ellas de gran importancia para la estrategia desarrollada en el presente trabajo. La vía de administración para el estudio *in vivo* utilizada en este trabajo ha sido la inyección local en el núcleo estriado mediante un procedimiento estereotáxico. Este método aunque invasivo, permite una gran especificidad en aquellos casos en los que interese limitar el radio de acción a un punto o una estructura concreta, además de mostrar una gran reproducibilidad en los resultados (Cetin et al., 2006). Mediante este procedimiento se ha conseguido un área máxima de transducción viral focalizada en el núcleo estriado y que abarca unos 2 mm en el eje rostrocaudal, similar a lo descrito en otros estudios en donde se estiman unos volúmenes de transducción de entre 1.2 - 2 mm³ (Burger et al., 2004; Taymans et al., 2007). La ausencia de transporte retrógrado ha quedado de manifiesto tras observar unos niveles despreciables de actividad luciferasa en otras áreas cerebrales, tal y como se descrito en otros trabajos en los que se utiliza el AAV-2 (Burger et al., 2004; Taymans et al., 2007), indicando que el efecto mediado por AAV-shDyrk1A quedaba limitado al núcleo estriado. El análisis de la expresión de Dyrk1A tras la administración intraestriatal de AAV-shDyrk1A en animales TgDyrk1A ha evidenciado la funcionalidad del virus generado, observándose una reducción persistente de la expresión de la proteína hasta los 8 meses post-inyección. Estos resultados ayudaron a definir el marco temporal para el estudio de corrección fenotípica llevado a cabo en el modelo TgDyrk1A.

El uso de la terapia génica con vectores virales basada en el RNAi ha demostrado previamente su efectividad en el contexto de las enfermedades del SNC con fenotipo motor. Se han descrito varios estudios realizados sobre modelos preclínicos en los que se demuestra la reducción o el silenciamiento de alelos mutantes con la posterior corrección de alteraciones motoras en modelos preclínicos de enfermedades como la ataxia espinocerebelar de tipo I (Xia et al., 2004), la esclerosis lateral amiotrófica (Ralph et al., 2005; Raoul et al., 2005), Huntington (Harper et al., 2005), Alzheimer (Singer et al., 2005) o Parkinson (Sapru et al., 2006). En la mayor parte de estos trabajos, la estrategia desarrollada está dirigida al silenciamiento de alelos mutantes por lo que interesa la inhibición total del transcrito diana. Sin embargo, la estrategia desarrollada en este trabajo se ha encaminado a reducir la sobreexpresión proteica de Dyrk1A y alcanzar los valores propios de animales control, es decir sin silenciar totalmente la expresión del gen ya que esto podría ser

deletéreo para las células y tener un efecto nocivo para los animales tratados. Esto supone un reto debido a la existencia de un umbral terapéutico en cuyos límites es efectiva la estrategia planteada y fuera de los cuales, ésta se muestra ineficaz o tóxica. En este trabajo, no se ha analizado el grado de inhibición de la expresión de Dyrk1A por célula en el núcleo estriado de los animales tratados debido a la falta de una técnica adecuada para ello. El hecho de que el análisis histológico de secciones correspondientes al área inyectada no revelara alteraciones celulares junto con los resultados obtenidos en las pruebas conductuales postoperatorias sugieren la ausencia de efectos negativos debidos a una depleción de Dyrk1A. Sin embargo no se descarta que aquellas neuronas más próximas al lugar de la inyección contengan unos niveles por debajo del umbral terapéutico de Dyrk1A debido a una mayor transducción viral. Sin embargo, este efecto no deseado de silenciamiento se diluiría conforme nos alejamos del punto de inyección, estableciéndose un gradiente decreciente de inhibición de Dyrk1A. Así, la ausencia de Dyrk1A en un pequeño número de neuronas se vería compensada por una expresión normalizada en un gran número de ellas, lo cual no tendría ninguna repercusión funcional negativa. Hay que tener en cuenta que el núcleo estriado es una estructura que presenta gran homogeneidad estructural si bien se ha sugerido la existencia de cierta compartimentalización en el eje dorsoventral asociada a un gradiente de densidad de terminales dopaminérgicos (Wickens et al., 2007). Esta distinción entre estriado dorsal y ventral se ha asociado con diferentes funciones. Así, se ha descrito que la parte dorsal estaría implicada más bien en la ejecución motora mientras que la parte ventral iría asociada al aprendizaje (Atallah et al., 2007). En nuestro trabajo, la inyección viral se realizaba de tal modo que se repartía el volumen en dos puntos separados de 0.5 mm en el mismo eje dorsoventral, abarcando tanto la parte ventral como la dorsal del núcleo estriado. Esto nos aseguraba un efecto en los distintos procesos motores que se hallaban estructuralmente compartimentalizados.

La respuesta terapéutica también puede modularse mediante otros parámetros como la dosis viral inyectada, el promotor o el serotipo utilizados y la eficacia de la secuencia inhibidora diseñada. En este trabajo, el uso de un AAV de serotipo 2, el cual presenta un grado de difusión limitado, la dosis viral de 10^9 partículas virales por inyección, el uso del promotor U6 y una secuencia inhibidora eficiente han resultado ser condiciones adecuadas para obtener un efecto dentro del umbral terapéutico. Peviamente, únicamente un estudio ha descrito efectos terapéuticos tras la normalización (y no silenciamiento) de los niveles de una determinada proteína mediante la técnica del RNA de interferencia en el SNC. En este estudio el objetivo consistía en reducir la expresión endógena de la β -secretasa BACE1 en un modelo transgénico de sobreexpresión de APP mediante inyección en el hipocampo de lentivirus portadores de shRNAs contra BACE1. Los resultados mostraron una reducción de la deposición amiloide y una mejoría significativa en procesos como la

memoria y el aprendizaje, indicando un grado de reducción de la expresión de BACE1 dentro del umbral terapéutico (Singer et al., 2005).

Cambios en la expresión de Dyrk1A influyen en el fenotipo motor

1. El incremento en la expresión de Dyrk1A produce alteraciones motoras

Hay muchas evidencias que implican a Dyrk1A en las alteraciones motoras. Por un lado, la caracterización conductual de los ratones TgDyrk1A realizada en nuestro laboratorio reveló ciertas alteraciones motoras en los animales como son una hiperactividad moderada bajo condiciones aversivas, déficits en coordinación motora, alteraciones en el aprendizaje motor y en la organización del comportamiento locomotor (Altafaj et al., 2001; Martínez de Lagran et al., 2004). En el presente trabajo, se ha observado un fenotipo hiperactivo de los animales TgDyrk1A bajo condiciones no aversivas y por primera vez se ha detectado la existencia de alteraciones en el mecanismo de inhibición mediada por prepulso en dicho modelo, lo que pone de manifiesto déficits en las vías de integración sensoriomotora (Campbell et al., 2007). Se ha descrito la presencia de estos déficits en pacientes con esquizofrenia (Van den Buuse et al., 2003) y han demostrado ser de gran importancia en la patofisiología de las alteraciones motoras presentes en enfermedades como Parkinson o Huntington (Abbruzzese and Berardelli, 2003). Todos estos resultados conductuales se correlacionan con el patrón de expresión de Dyrk1A en el cerebro de ratones transgénicos adultos, en donde la mayor inmunoreactividad detectada procede de áreas motoras específicas como el cerebelo o diversos núcleos motores (Altafaj et al., 2001). Por otro lado, también se ha detectado la presencia de alteraciones motoras en otros modelos de sobreexpresión de Dyrk1A como hiperactividad durante el desarrollo del ratón YAC152F7tel (Branchi et al., 2004) o hiperactividad y problemas de coordinación motoras en el modelo trisómico Ts65Dn (Escorihuela et al., 1995; Coussons-Read and Crnic, 1996; Costa et al., 1999). Mientras, en el modelo murino haploinsuficiente para Dyrk1A se detectó una marcada hipoactividad y ciertas alteraciones en el control motor (Fotaki et al., 2002; Fotaki et al., 2004). En individuos con SD, la disfunción motora es una de las alteraciones más frecuentes. Desde etapas tempranas, los niños con SD presentan un retraso en el desarrollo locomotor y déficits en el control postural (Vicari, 2006). También se han descrito problemas de coordinación motora posiblemente debidos a una incapacidad de modular la intensidad de activación de las motoneuronas (Latash and Corcos, 1991; Latash and Anson, 2006). Además, en algunos casos se ha detectado hiperactividad (Pueschel et al., 1991; Stores et al., 1998).

Uno de los sustratos anatómicos responsables del control motor que podría estar afectado en el modelo TgDyrk1A es el núcleo estriado. Dicha estructura, incluida dentro de los denominados

ganglios basales, desempeña un papel crucial en el control de la actividad motora a través del eje cortico-striato-palidal (córtex motor-núcleo estriado-globo pálido) y se le considera clave para que pueda darse una correcta ejecución motora (Chan et al., 2005; Tachibana et al., 2008). Además se le atribuye un importante papel en la adquisición del aprendizaje motor (Hallett et al., 2006; Popescu et al., 2007). Se ha visto que alteraciones en las aferencias dopaminérgicas del núcleo estriado causadas por la degeneración de las neuronas de la substantia nigra es la causa principal de los síntomas de la enfermedad del Parkinson entre los que se incluyen el temblor, la rigidez, la bradiquinesia o alteraciones del equilibrio y la coordinación (Hammond et al., 2007). Estos datos llevaron a pensar que la sobreexpresión de Dyrk1A en el núcleo estriado podría ser contribuyendo a la aparición de las alteraciones motoras presentes en el modelo. Así pues, en este trabajo se ha elegido dicha estructura como diana para estudiar los efectos derivados de reducir la expresión de Dyrk1A en el fenotipo motor de los animales transgénicos.

2. La reducción de la expresión de Dyrk1A corrige las alteraciones motoras de TgDyrk1A

La administración intraestriatal del virus AAV-shDyrk1A en los ratones TgDyrk1A adultos ha dado lugar a la corrección de ciertas alteraciones motoras. En concreto, se ha observado una reducción de la hiperactividad llegando a detectarse valores similares a los de los ratones control, una notable mejoría en los déficits de coordinación motora, y por último, un aumento de la respuesta inhibitoria mediada por un prepulso, indicativo de una mejoría en las vías de integración sensoriomotora. Estos efectos de corrección fenotípica se detectaron al menos hasta los 4 meses post-inyección que duró el estudio. La persistencia de la corrección de los déficits en coordinación motora al menos hasta los 4 meses ha sido descrito también en otro estudio en el que se administran AAV-1 en el núcleo estriado y en el cerebelo de un modelo murino de la enfermedad de Huntington (Harper et al., 2005). Teniendo en cuenta que se ha observado una reducción de Dyrk1A se mantenía al menos hasta los 8 meses después de la administración de AAV-shDyrk1A, sería posible que los efectos de corrección fenotípica pudieran mantenerse un periodo más largo. Otro aspecto de gran interés en el presente trabajo deriva del hecho de corregir alteraciones presentes desde el neurodesarrollo mediante una dosis aguda de AAV-shDyrk1A realizada en el animal adulto. Existen muchas evidencias del papel de Dyrk1A en el neurodesarrollo, concretamente en procesos de proliferación y diferenciación neuronal (Dierssen and de Lagran, 2006) pero poco se sabe de sus funciones en el adulto. Los resultados de este trabajo apuntan a un papel relevante de Dyrk1A en la fisiología del SNC adulto, sugerido anteriormente a raíz de los análisis de expresión realizados sobre el cerebro adulto tanto murino (Okui et al., 1999; Marti et al., 2003) como humano (Wegiel et al., 2004). Recientemente se ha sugerido un papel de compensación neuronal de ciertos genes del cromosoma

21, entre ellos Dyrk1A en el proceso de envejecimiento del cerebro adulto de individuos con SD tras la observación de discordancias entre la aparición de los síntomas neuropatológicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer y la aparición de la demencia (Head et al., 2007). Varios estudios han asociado también la sobreexpresión de Dyrk1A con dichos síntomas neuropatológicos por medio de la hiperfosforilación de Tau, lo que inhibiría el ensamblaje de los microtúbulos (Kimura et al., 2007; Ryoo et al., 2007). Todos estos datos junto con el efecto pleiotrópico que sugiere el papel de los sustratos de Dyrk1A, muchos de los cuales tiene una función reconocida en tejidos adultos (ap. 3.5. Intro.) ponen de manifiesto la importancia de una correcta expresión de Dyrk1A en el cerebro adulto. Estos resultados de corrección fenotípica también confirman el papel del núcleo estriado en los distintos paradigmas motores estudiados en este trabajo y señalan su importancia como diana terapéutica en aquellas patologías que cursen con alteraciones análogas a las descritas en el modelo TgDyrk1A.

Implicación del receptor NMDA de glutamato en el fenotipo motor

Los mecanismos moleculares a través de los cuales los cambios en la expresión de Dyrk1A conducen a las alteraciones motoras observadas en el modelo TgDyrk1A o a la corrección de las mismas se desconocen.

Unas primeras indicaciones proceden de los estudios realizados en el presente trabajo en el que hemos podido determinar cómo la variación de la expresión de Dyrk1A modula la expresión de las subunidades NR2A, NR2B, NR2C y NR1 del receptor NMDA de glutamato en el cerebelo y el núcleo estriado de los ratones TgDyrk1A. Concretamente los resultados mostraron un incremento en los niveles proteicos de las subunidades NR2A, NR2C y NR1, y de NR2A, NR2C y NR1 en el cerebelo y núcleo estriado respectivamente, del ratón adulto TgDyrk1A con respecto al control. El análisis inmunohistoquímico realizado en ambas estructuras no reveló cambios en el patrón de distribución celular, indicando que era la variación en el contenido proteico y no su distribución lo que podría estar provocando las distintas alteraciones. Otros datos proceden de los resultados obtenidos tras la reducción de Dyrk1A en el núcleo estriado de los ratones adultos TgDyrk1A. Se observó que las subunidades NR2A y NR1 del receptor NMDA veían disminuida su expresión como consecuencia de la reducción de los niveles proteicos de Dyrk1A.

Todos estos datos sugieren la implicación del receptor NMDA en las alteraciones motoras presentes en el modelo TgDyrk1A. Existen múltiples evidencias en las que variaciones en la expresión de subunidades del receptor NMDA se han asociado a alteraciones motoras. Así, la expresión sostenida a lo largo de toda la vida del ratón de la subunidad NR2B, que en situación fisiológica se expresa sólo en etapas postnatales y no en adulto, provoca una reducción en el contenido proteico

de la subunidad NR2A y en consecuencia los ratones presentan déficits motores (Schlett et al., 2004). Sin embargo, también se ha descrito que la sobreexpresión de NR2B únicamente en las células granulares de la corteza cerebelar y a partir del día 14 postnatal, provoca un efecto positivo sobre el aprendizaje motor inducido por un entrenamiento previo (Jiao et al., 2008). Por otro lado, ratones deficientes para las subunidades NR2A y NR2C en el cerebelo presentan alteraciones en coordinación motora (Kadotani et al., 1996). La relación entre los receptores de NMDA en el estriado y las alteraciones motoras también han sido descritas en distintos estudios. En uno, la depleción in vivo de la subunidad NR1 en el núcleo estriado provoca alteraciones en los procesos de LTD y LTP además de déficits en el aprendizaje motor (Dang et al., 2006) mientras que en otro, la administración de NMDA en el estriado a dosis excitotóxicas causa cierta disrupción en el comportamiento motor (Haelewyn et al., 2007). También se ha implicado al receptor de NMDA en el núcleo estriado en las disfunciones motoras asociadas a la enfermedad del Parkinson. Así, varios estudios apuntan a cambios en su distribución subcelular mediados por la fosforilación de las distintas subunidades en residuos de serina y tirosina como uno de los mecanismos subyacentes en dicha enfermedad (Chase, 2004; Dunah et al., 2004). Todos estos datos muestran la importancia de una expresión correcta de las distintas subunidades y de su regulación espacio-temporal en el control de procesos motores. Así, también ponen de manifiesto cambios en el fenotipo motor como consecuencia de alteraciones NMDA-dependientes, tanto en la aparición de disfunciones como en la mejoría de la capacidad motora.

Consecuencias funcionales de la desregulación del receptor NMDA a nivel celular

La desregulación de la subunidad NR2A en el TgDyrk1A se ha observado también en sinaptosomas procedentes de cerebelo adulto y en cultivos primarios de CGNs. En ambos casos, se detectó una sobreexpresión de NR2A, además de la de Dyrk1A en el animal TgDyrk1A con respecto al control. Este aumento en los niveles proteicos de NR2A iba asociado a una mayor presencia de la proteína en la membrana sináptica. Se ha descrito que la presencia de NR2A en membrana sólo es posible tras el ensamblaje previo con otras subunidades, entre ellas las constitutivas NR1, en el retículo endoplasmático (McIlhinney et al., 1998), por lo que los resultados sugieren la presencia de un mayor número de receptores de NMDA con localización sináptica. Estas alteraciones en el contenido de NR2A en el animal TgDyrk1A han podido asociarse a cambios en la funcionalidad de los receptores. Así, en los sinaptosomas procedentes de cerebelos transgénicos, se detectó un incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular tras la activación de los receptores, previa administración de NMDA. En colaboración con el grupo del Dr. V.Ceña, se estudiaron las posibles consecuencias funcionales derivadas de la sobreexpresión de NR2A en cultivos de CGNs procedentes de animales TgDyrk1A. Para ello, se midieron distintos parámetros relacionados con la

cinética del Ca^{2+} intracelular tras administración de NMDA. Los resultados mostraron que no existían diferencias en el pico máximo ni tampoco en la amplitud de la corriente del Ca^{2+} entrante tras la activación de los canales de NMDA comparando entre genotipos. Esto estaría de acuerdo con resultados existentes en los que la sobreexpresión de NR2A incrementa la cantidad de receptores en la membrana pero no se ven alterados ni la amplitud de las corrientes excitatorias postsinápticas (miniatura; *mEPSC*), ni la conductancia de un sólo canal (Prybylowski et al., 2002). Sin embargo, se detectó un aumento en la constante τ (Tau) de recuperación de los niveles basales de Ca^{2+} intracelular indicando un transiente más prolongado de calcio mediado por el NMDA en el modelo TgDyrk1A.

El paradigma neuropatológico de excitotoxicidad es el resultado de la sobreactivación de los receptores de NMDA mediada por el glutamato. Esto provoca una entrada masiva de Ca^{2+} al interior de la célula que llevará a la muerte celular por apoptosis. El estudio de la respuesta excitotóxica en CGNs procedentes de ratones control y ratones TgDyrk1A reveló que la adición de glutamato provocaba un efecto de muerte neuronal que era dosis dependiente y que la acción de un antagonista no competitivo de los receptores de NMDA, MK-801, bloqueaba su efecto. Sin embargo la respuesta observada fue similar para ambos genotipos, indicando que la sobreexpresión de NR2A presente en las CGNs TgDyrk1A no modificaba la susceptibilidad mediada por un insulto excitotóxico. Recientemente, se ha descrito en un estudio realizado sobre neuronas de hipocampo que la mayor susceptibilidad a dosis excitotóxicas de glutamato asociada a la edad de cultivo era debida a un incremento en la expresión de las subunidades NR2A y NR1 y al consiguiente incremento de las corrientes mediadas por los receptores de NMDA (Brewer et al., 2007). Esta aparente discordancia entre el estudio de Brewer y el nuestro podría deberse a que en las CGNs procedentes de TgDyrk1A, la sobreexpresión de NR2A no provoca cambios en las corrientes mediadas por el receptor de NMDA, sino que conduce a una recuperación más lenta de los niveles basales de Ca^{2+} intracelular. Este hecho podría no estar influyendo en un paradigma de sobreactivación de los receptores de NMDA como son las condiciones excitotóxicas, en los que los sistemas intracelulares de tamponamiento resultan ineficaces y por lo tanto los niveles basales de Ca^{2+} intracelular no llegan a recuperarse.

Así, se podría pensar que si bien la sobreexpresión de Dyrk1A estaría afectando la entrada mediada por los canales NMDA, esta mayor entrada podría verse compensada por los sistemas de tamponamiento de Ca^{2+} intracelular (retículo endoplasmático, bombas de Ca^{2+} dependientes de ATP), los cuales podrían a su vez estar afectados por la sobreexpresión de Dyrk1A y dar lugar a una recuperación más lenta de los niveles de Ca^{2+} intracelular. Resultados similares se han descrito en el modelo trisómico para el cromosoma 16 murino (MMU16), el Ts16, sobre cultivos de células de

hipocampo, en los que la sobreexpresión de NR2A no produce cambios en las corrientes mediadas por NMDA (Klein et al., 2001), pero sí en la cinética de recuperación de los niveles basales del Ca^{2+} intracelular (Cardenas et al., 2002). Esta alteración en la constante de recuperación produciría un incremento transitorio del calcio intracelular siempre que hubiera una activación de los canales de NMDA. Este hecho podría alterar aquellas vías de señalización mediadas por proteínas reguladas por Ca^{2+} como la familia de las calmodulina quinasas (CamK), la calcineurina o la proteína quinasa C (PK-C) entre otras.

El mecanismo responsable de la desregulación de las subunidades del receptor NMDA está por dilucidar aunque los datos de microarrays de cerebelo adulto en los que se detectó una sobreexpresión a nivel de RNAm de la subunidad NR2A apuntarían a una regulación a nivel transcripcional (ver Altafaj et al., ANEXO). DYRK1A es una quinasa que fosforila a múltiples sustratos citosólicos y nucleares entre los cuales hay diversos factores de transcripción como CREB, STAT-3, FKHD o GLI-1. Una posible hipótesis apunta a que la sobreexpresión de DYRK1A podría dar lugar a una mayor activación de alguno/s de estos factores de transcripción que a su vez actuarían sobre el promotor de NR2A y quizá, de el resto de subunidades. Un potencial candidato sería CREB (*cAMP response element binding protein*) (Yang et al., 2001). Se ha demostrado que en el núcleo celular DYRK1A fosforila a CREB dando lugar a su forma activa capaz de unirse a los elementos CRE de regiones promotoras y activar la transcripción. Se ha descrito la presencia de elementos CRE en los promotores de NR2A, NR1 y NR2B (Klein et al., 1998; Desai et al., 2002), y en un estudio reciente se ha demostrado que la actividad transcripcional del promotor de NR2B aumentaba como consecuencia de la unión de la forma fosforilada de CREB en respuesta al etanol (Rani et al., 2005). Además de CREB, otros muchos factores podrían verse implicados en la regulación transcripcional de las subunidades de NMDA.

Alternativamente, la sobreexpresión de Dyrk1A podría estar actuando únicamente sobre la transcripción de la subunidad NR2A y como consecuencia, estabilizar la formación de heterodímeros mediante mecanismos postranscripcionales, observándose así un mayor contenido en el resto de subunidades. Sin embargo, si bien hay estudios in vitro que apoyarían esta hipótesis (Saito et al., 2003) también hay datos que apuntan a que la sobreexpresión de una de ellas provoca un desbalance y en consecuencia la disminución en las otras subunidades (Okabe et al., 1998; Schlett et al., 2004). La estabilización de receptores de NMDA en la membrana sináptica es un proceso clave en fenómenos como la plasticidad sináptica y está altamente regulado. La sobreexpresión de Dyrk1A podría conducir a una mayor estabilización de receptores en membrana mediante un mecanismo de regulación basado en la endocitosis de los receptores de NMDA mediada por vesículas de clatrina en el cual estarían interviniendo la dinamina y la amfifisina-1

(Nong et al., 2003; Montgomery et al., 2005; Chen et al., 2007), las cuales son sustratos conocidos de Dyrk1A (Chen-Hwang et al., 2002; Murakami et al., 2006). Otros sustratos de Dyrk1A, la sinaptojanina1 (Adayev et al., 2006) e Hip-1 (Kang et al., 2005) también tienen un papel en el aparato endocítico y recientemente se le ha descrito a Hip-1 su implicación en la respuesta del receptor NMDA a un estímulo excitotóxico (Metzler et al., 2007). De alguna manera, Dyrk1A podría estar interviniendo en la regulación la maquinaria endocítica de los receptores NMDA por medio de una fosforilación de algunos de los componentes de dicha maquinaria tal y como se ha descrito en un estudio realizado sobre neuronas de hipocampo en el que la cofosforilación de dinamina y anfifisina mediada por la serin-treonin quinasa Cdk5 conducía a la inhibición de la vía endocítica (Tomizawa et al., 2003). Así, una sobreexpresión de Dyrk1A podría estar interfiriendo en la maquinaria endocítica a través de una fosforilación aumentada o sostenida de distintos sustratos como dinamina, anfifisina, sinaptojanina1 o HIP-1, y tener como consecuencia la presencia de una mayor cantidad de receptores de NMDA en membrana sináptica, acorde con lo observado en este trabajo. Otra posibilidad consistiría en una acción directa sobre el receptor NMDA por medio de la fosforilación de NR2A ya que se ha descrito la existencia de un sitio consenso de fosforilación para Dyrk1A en su región promotora. Esta hipótesis está siendo investigada actualmente en el laboratorio.

Implicaciones terapéuticas para el SD

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la estrategia de terapia génica basada en el RNAi desarrollada en el presente trabajo demuestra su validez para la reducción de la expresión de Dyrk1A en aquellos contextos en los que se produzca una sobreexpresión proteica con la consiguiente aparición de alteraciones fenotípicas, tales como las disfunciones motoras presentes en el modelo TgDyrk1A. El SD es uno de estos contextos en los que se ha demostrado la sobreexpresión de Dyrk1A, tanto en muestras de cerebro fetal como adulto (Dowjat et al., 2007) y recientemente también se ha descrito la presencia de una mayor expresión de Dyrk1A en los núcleos de ciertas neuronas en hipocampo y córtex en muestras de pacientes con Alzheimer o enfermedad de Pick (Ferrer et al., 2005). Hay evidencias suficientes que permiten considerar a Dyrk1A un gen candidato responsable de ciertos fenotipos neurológicos. Quizá la asociación más clara provenga de estudios recientes en los que se demuestra la participación del gen en los síntomas neuropatológicos asociados a la enfermedad de Alzheimer, a través de la hiperfosforilación de Tau (Ferrer et al., 2005; Kimura et al., 2007; Ryoo et al., 2007). Una aproximación que permita elucidar la contribución de Dyrk1A en los fenotipos presentes en el SD consistiría en aplicar la estrategia desarrollada en este trabajo sobre el modelo murino trisómico Ts65Dn. Así, la administración de AAV-shDyrk1A mediante inyección estereotáxica en el núcleo

estriado de dichos animales ayudaría a confirmar la contribución de Dyrk1A en las alteraciones motoras presentes en un contexto trisómico. De igual modo, la inyección del virus en otras áreas cerebrales como el hipocampo nos permitiría dilucidar la contribución de Dyrk1A en los déficits cognitivos asociados a memoria y aprendizaje presentes en los ratones Ts65Dn, estrategia que está siendo estudiada en el laboratorio.

Si bien la aproximación desarrollada en este trabajo permitiría valorar la capacidad correctiva de alteraciones fenotípicas en modelos con SD, esta estrategia tendría una poca o nula aplicabilidad dado el carácter invasivo del procedimiento estereotáxico. Si bien la neurocirugía estereotáxica es comúnmente utilizada para la obtención de biopsias, la resección de tumores cerebrales e incluso en el tratamiento para el Parkinson, presenta ciertos riesgos debidos al procedimiento en sí mismo a los que se suman los derivados de la aplicación de anestesia general utilizada en el caso de los niños. Alternativamente, habría que pensar en estrategias que pudieran ser administradas por vía oral o endovenosa. Sin embargo, una de las principales limitaciones sería la presencia de la barrera hematoencefálica que dificulta el paso de las moléculas terapéuticas al cerebro. Sin embargo, recientemente, han surgido los primeros resultados relativos a estrategias de terapia génica no invasiva encaminadas a atravesar la barrera y hacer llegar siRNAs al SNC tras una administración intravenosa. En estos estudios, se ha aplicado un péptido derivado de una glicoproteína del virus de la rabia, el cual se une específicamente al receptor de acetilcolina, como vehículo de paso a través de la barrera hematoencefálica. Dicho péptido se mantenía unido a los siRNAs por medio de nonámeros de argininas. Los resultados confirmaron no sólo la presencia de los siRNAs en el cerebro de los animales tras una administración intravenosa, sino también su efectividad en la protección contra el virus de la encefalitis (Kumar et al., 2007). La combinación de este tipo de estrategias junto con otras dirigidas a obtener una mayor estabilidad de los siRNAs en suero permitiría el desarrollo de terapias no invasivas. Sin embargo la principal limitación radica en la transitoriedad del efecto ya que los siRNAs son degradados con relativa facilidad.

La posibilidad de la intervención terapéutica en el SD ha dado nuevos pasos. En este último año, varios estudios han mostrado el potencial terapéutico de ciertos compuestos tanto sobre los déficits cognitivos relacionados con la memoria y el aprendizaje como en la hiperactividad presentes en el modelo trisómico Ts65Dn. Son el caso de un inhibidor gabaérgico (picrotoxina) (Fernandez et al., 2007), de un análogo del piracetam que previene el estrés oxidativo (SGS-111) (Rueda et al., 2008) y de un antagonista no competitivo de los receptores de NMDA (memantina) (Costa et al., 2007). Los resultados obtenidos en este último trabajo apoyan la hipótesis de una potencial implicación de los receptores de NMDA en la patogénesis del SD, en la línea de lo planteado en el presente trabajo para las alteraciones motoras presentes en el modelo TgDyrk1A. Por lo que se podría pensar que la

normalización de la actividad fisiológica de los receptores de NMDA podría corregir las alteraciones NMDA-dependientes en el modelo TgDyrk1A. En el caso de inhibidores farmacológicos para Dyrk1A, recientemente se ha descrito la función inhibitoria de un compuesto, la harmina, sobre su actividad quinasa (Bain et al., 2007). Sin embargo, también presenta un efecto inhibitor sobre las monoamino-oxidasas (MAO), enzimas que metabolizan neurotransmisores como la serotonina o norepinefrina. Esto limita su potencial uso terapéutico.

En un paso más en la implicación terapéutica de los resultados obtenidos en esta tesis, se puede hipotetizar sobre una aplicación similar a la desarrollada en este trabajo contra otros genes hallados sobreexpresados en el SD. Así, otro gen que ha demostrado ser un potencial candidato en el fenotipo SD es DSCR1. Recientemente se ha descrito el papel sinérgico de Dyrk1A y Dscr1 en la desregulación de las vías controladas por el factor de transcripción NFAT (Arron et al., 2006). La fosforilación de éste por parte del primero y la inhibición de la fosfatasa calcineurina por parte del segundo, conducen a un secuestro citoplasmático de NFAT, evitando así que pueda desempeñar su función. El modelo doble transgénico para ambos genes presenta alteraciones cardíacas similares a las presentes en el SD. No hay que olvidar la condición trisómica de este síndrome, así este estudio subraya la importancia del efecto combinado de dos o más genes sensibles a dosis presentes en el cromosoma 21 que potencian el efecto mediado por cada uno de ellos de forma individualizada. La estrategia planteada en este trabajo abre la posibilidad al desarrollo de terapias combinadas contra la sobreexpresión de varios de esos genes. Así, el uso de vectores virales policistrónicos que codifiquen para varios shRNAs dirigidos contra los principales genes candidatos implicados en el SD podría convertirse en el futuro en una buena estrategia terapéutica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de Dyrk1A produce una modulación en la expresión de las subunidades del receptor NMDA de glutamato en ciertas estructuras motoras como son el cerebelo y el núcleo estriado. En el cerebelo de ratones TgDyrk1A adultos y en la etapa del desarrollo P14 se observa un incremento en los niveles proteicos de las subunidades NR2A, NR2C, NR1, y de NR2A, NR2B, NR2C y NR1, respectivamente. Sin embargo en el cerebelo de ratones TgDyrk1A P7, se detecta una reducción de la expresión de NR2A, NR2B y NR1. En el núcleo estriado de ratones TgDyrk1A.adultos, la expresión de las subunidades NR2A, NR2B y NR1 se halla incrementada respecto a los ratones control. Los cambios de expresión de las subunidades no se asocian a cambios en la localización celular en ninguna de las estructuras.
2. La desregulación del receptor NMDA en CGNs de TgDyrk1A da lugar a un enlentecimiento en la cinética de recuperación de los niveles de Ca^{2+} intracelular tras activación por NMDA. Sin embargo no se observan cambios en la susceptibilidad de las neuronas TgDyrk1A frente a un estímulo excitotóxico.
3. La caracterización del fenotipo motor de los ratones TgDyrk1A muestra que la sobreexpresión de Dyrk1A causa hiperactividad en condiciones no aversivas, déficits en coordinación motora y alteraciones en las vías de integración sensoriomotora.
4. Se ha desarrollado una estrategia de terapia génica basada en un vector adenoasociado recombinante (AAV-shDyrk1A) portador de un shRNA que inhibe específicamente el gen DYRK1A. La inyección de AAV-shDyrk1A en el núcleo estriado de los ratones TgDyrk1A provoca una reducción en la expresión de Dyrk1A que se puede detectar hasta los 8 meses postinyección.
5. La reducción de la expresión de Dyrk1A en el núcleo estriado de ratones adultos TgDyrk1A corrige la hiperactividad y los déficits en coordinación motora características de este modelo.
6. La reducción de la expresión de Dyrk1A en el núcleo estriado produce una mejoría en las vías de integración sensoriomotora de los ratones adultos TgDyrk1A.

7. La reducción de la expresión de Dyrk1A tras inyección de AAV-shDyrk1A en el núcleo estriado se asocia a una disminución en la expresión de las subunidades NR2A y NR1 del receptor NMDA de glutamato.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Aarts M, Liu Y, Liu L, Besshoh S, Arundine M, Gurd JW, Wang YT, Salter MW, Tymianski M (2002) Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. *Science* 298:846-850.
- Abbruzzese G, Berardelli A (2003) Sensorimotor integration in movement disorders. *Mov Disord* 18:231-240.
- Adayev T, Chen-Hwang MC, Murakami N, Wang R, Hwang YW (2006) MNB/DYRK1A phosphorylation regulates the interactions of synaptojanin 1 with endocytic accessory proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 351:1060-1065.
- Adayev T, Chen-Hwang MC, Murakami N, Lee E, Bolton DC, Hwang YW (2007) Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A does not require tyrosine phosphorylation for activity in vitro. *Biochemistry* 46:7614-7624.
- Ahmed BY, Chakravarthy S, Eggers R, Hermens WT, Zhang JY, Niclou SP, Levelt C, Sablitzky F, Anderson PN, Lieberman AR, Verhaagen J (2004) Efficient delivery of Cre-recombinase to neurons in vivo and stable transduction of neurons using adeno-associated and lentiviral vectors. *BMC Neurosci* 5:4.
- Ahn KJ, Jeong HK, Choi HS, Ryoo SR, Kim YJ, Goo JS, Choi SY, Han JS, Ha I, Song WJ (2006) DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiol Dis* 22:463-472.
- Aldridge K, Reeves RH, Olson LE, Richtsmeier JT (2007) Differential effects of trisomy on brain shape and volume in related aneuploid mouse models. *Am J Med Genet A* 143:1060-1070.
- Altafaj X, Dierssen M, Baamonde C, Marti E, Visa J, Guimera J, Oset M, Gonzalez JR, Florez J, Fillat C, Estivill X (2001) Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum Mol Genet* 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. *J Cell Sci* 116:3099-3107.
- Alvarez M, Altafaj X, Aranda S, de la Luna S (2007) DYRK1A autophosphorylation on serine residue 520 modulates its kinase activity via 14-3-3 binding. *Mol Biol Cell* 18:1167-1178.
- Amano K, Sago H, Uchikawa C, Suzuki T, Kotliarova SE, Nukina N, Epstein CJ, Yamakawa K (2004) Dosage-dependent over-expression of genes in the trisomic region of Ts1Cje mouse model for Down syndrome. *Hum Mol Genet* 13:1333-1340.
- Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Raymond A, Deutsch S (2004) Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet* 5:725-738.
- Arron JR, Winslow MM, Polleri A, Chang CP, Wu H, Gao X, Neilson JR, Chen L, Heit JJ, Kim SK, Yamasaki N, Miyakawa T, Francke U, Graef IA, Crabtree GR (2006) NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* 441:595-600.
- Atallah HE, Lopez-Paniagua D, Rudy JW, O'Reilly RC (2007) Separate neural substrates for skill learning and performance in the ventral and dorsal striatum. *Nat Neurosci* 10:126-131.
- Attwell D, Gibb A (2005) Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci* 6:841-849.
- Aylward EH, Habbak R, Warren AC, Pulsifer MB, Barta PE, Jerram M, Pearlson GD (1997) Cerebellar volume in adults with Down syndrome. *Arch Neurol* 54:209-212.

- Azzouz M, Hottinger A, Paterna JC, Zurn AD, Aebischer P, Bueler H (2000) Increased motoneuron survival and improved neuromuscular function in transgenic ALS mice after intraspinal injection of an adeno-associated virus encoding Bcl-2. *Hum Mol Genet* 9:803-811.
- Bahler J, Pringle JR (1998) Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev* 12:1356-1370.
- Bahn S, Mimmack M, Ryan M, Caldwell MA, Jauniaux E, Starkey M, Svendsen CN, Emson P (2002) Neuronal target genes of the neuron-restrictive silencer factor in neurospheres derived from fetuses with Down's syndrome: a gene expression study. *Lancet* 359:310-315.
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408:297-315.
- Banke TG, Traynelis SF (2003) Activation of NR1/NR2B NMDA receptors. *Nat Neurosci* 6:144-152.
- Bankiewicz KS, Eberling JL, Kohutnicka M, Jagust W, Pivrotto P, Bringas J, Cunningham J, Budinger TF, Harvey-White J (2000) Convection-enhanced delivery of AAV vector in parkinsonian monkeys; in vivo detection of gene expression and restoration of dopaminergic function using pro-drug approach. *Exp Neurol* 164:2-14.
- Barlow GM, Chen XN, Shi ZY, Lyons GE, Kurnit DM, Celle L, Spinner NB, Zackai E, Pettenati MJ, Van Riper AJ, Vekemans MJ, Mjaatvedt CH, Korenberg JR (2001) Down syndrome congenital heart disease: a narrowed region and a candidate gene. *Genet Med* 3:91-101.
- Baxter LL, Moran TH, Richtsmeier JT, Troncoso J, Reeves RH (2000) Discovery and genetic localization of Down syndrome cerebellar phenotypes using the Ts65Dn mouse. *Hum Mol Genet* 9:195-202.
- Becker LE (1991) Synaptic dysgenesis. *Can J Neurol Sci* 18:170-180.
- Becker LE, Armstrong DL, Chan F (1986) Dendritic atrophy in children with Down's syndrome. *Ann Neurol* 20:520-526.
- Becker W, Joost HG (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 FJ, Joost HG (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 PV, Masliah E, Kleschevnikov AM, Villar AJ, Epstein CJ, Salehi A, Mobley WC (2004) Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of Down Syndrome. *J Comp Neurol* 480:281-298.
- Benavides-Piccione R, Dierssen M, Ballesteros-Yanez I, Martinez de Lagran M, Arbones ML, Fotaki V, DeFelipe J, Elston GN (2005) Alterations in the phenotype of neocortical pyramidal cells in the Dyrk1A^{+/-} mouse. *Neurobiol Dis* 20:115-122.
- Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, Ilsley-Tyree D, Leake D, Fedorov Y, Baskerville S, Maksimova E, Robinson K, Karpilow J, Marshall WS, Khvorova A (2006) 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods* 3:199-204.
- Boado RJ (2005) RNA interference and nonviral targeted gene therapy of experimental brain cancer. *NeuroRx* 2:139-150.
- Bosch A, Perret E, Desmaris N, Heard JM (2000) Long-term and significant correction of brain lesions in adult mucopolysaccharidosis type VII mice using recombinant AAV vectors. *Mol Ther* 1:63-70.

- Branchi I, Bichler Z, Minghetti L, Delabar JM, Malchiodi-Albedi F, Gonzalez MC, Chettouh Z, Nicolini A, Chabert C, Smith DJ, Rubin EM, Migliore-Samour D, 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.
- Brewer LD, Thibault O, Staton J, Thibault V, Rogers JT, Garcia-Ramos G, Kraner S, Landfield PW, Porter NM (2007) Increased vulnerability of hippocampal neurons with age in culture: temporal association with increases in NMDA receptor current, NR2A subunit expression and recruitment of L-type calcium channels. *Brain Res* 1151:20-31.
- Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R (2003) Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34:263-264.
- Broekman ML, Comer LA, Hyman BT, Sena-Esteves M (2006) Adeno-associated virus vectors serotyped with AAV8 capsid are more efficient than AAV-1 or -2 serotypes for widespread gene delivery to the neonatal mouse brain. *Neuroscience* 138:501-510.
- Brown BD, Venneri MA, Zingale A, Sergi L, Naldini L (2006) Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat Med* 12:585-591.
- Brown FR, 3rd, Greer MK, Aylward EH, Hunt HH (1990) Intellectual and adaptive functioning in individuals with Down syndrome in relation to age and environmental placement. *Pediatrics* 85:450-452.
- Brown JH, Johnson MH, Paterson SJ, Gilmore R, Longhi E, Karmiloff-Smith A (2003) Spatial representation and attention in toddlers with Williams syndrome and Down syndrome. *Neuropsychologia* 41:1037-1046.
- Burger C, Gorbatyuk OS, Velardo MJ, Peden CS, Williams P, Zolotukhin S, Reier PJ, Mandel RJ, Muzyczka N (2004) Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther* 10:302-317.
- Campbell LE, Hughes M, Budd TW, Cooper G, Fulham WR, Karayanidis F, Hanlon MC, Stojanov W, Johnston P, Case V, Schall U (2007) Primary and secondary neural networks of auditory prepulse inhibition: a functional magnetic resonance imaging study of sensorimotor gating of the human acoustic startle response. *Eur J Neurosci* 26:2327-2333.
- Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA (2001) Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9742-9747.
- Cardenas AM, Allen DD, Arriagada C, Olivares A, Bennett LB, Caviedes R, Dagnino-Subiabre A, Mendoza IE, Segura-Aguilar J, Rapoport SI, Caviedes P (2002) Establishment and characterization of immortalized neuronal cell lines derived from the spinal cord of normal and trisomy 16 fetal mice, an animal model of Down syndrome. *J Neurosci Res* 68:46-58.
- Carlesimo GA, Marotta L, Vicari S (1997) Long-term memory in mental retardation: evidence for a specific impairment in subjects with Down's syndrome. *Neuropsychologia* 35:71-79.
- Casanova MF, Walker LC, Whitehouse PJ, Price DL (1985) Abnormalities of the nucleus basalis in Down's syndrome. *Ann Neurol* 18:310-313.
- Cearley CN, Wolfe JH (2007) A single injection of an adeno-associated virus vector into nuclei with divergent connections results in widespread vector distribution in the brain and global correction of a neurogenetic disease. *J Neurosci* 27:9928-9940.

- Cetin A, Komai S, Eliava M, Seeburg PH, Osten P (2006) Stereotaxic gene delivery in the rodent brain. *Nat Protoc* 1:3166-3173.
- Chamberlin NL, Du B, de Lacalle S, Saper CB (1998) Recombinant adeno-associated virus vector: use for transgene expression and anterograde tract tracing in the CNS. *Brain Res* 793:169-175.
- Chan CS, Surmeier DJ, Yung WH (2005) Striatal information signaling and integration in globus pallidus: timing matters. *Neurosignals* 14:281-289.
- Chang HS, Lin CH, Yang CH, Yen MS, Lai CR, Chen YR, Liang YJ, Yu WC (2007) Increased expression of Dyrk1a in HPV16 immortalized keratinocytes enable evasion of apoptosis. *Int J Cancer* 120:2377-2385.
- Chapman RS, Seung HK, Schwartz SE, Kay-Raining Bird E (1998) Language skills of children and adolescents with Down syndrome: II. Production deficits. *J Speech Lang Hear Res* 41:861-873.
- Chase TN (2004) Striatal plasticity and extrapyramidal motor dysfunction. *Parkinsonism Relat Disord* 10:305-313.
- Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415:793-798.
- Chen P, Gu Z, Liu W, Yan Z (2007) Glycogen synthase kinase 3 regulates N-methyl-D-aspartate receptor channel trafficking and function in cortical neurons. *Mol Pharmacol* 72:40-51.
- Chen-Hwang MC, Chen HR, Elzinga M, Hwang YW (2002) Dynamin is a minibrain kinase/dual specificity Yak1-related kinase 1A substrate. *J Biol Chem* 277:17597-17604.
- Chrast R, Scott HS, Madani R, Huber L, Wolfer DP, Prinz M, Aguzzi A, Lipp HP, Antonarakis SE (2000) Mice trisomic for a bacterial artificial chromosome with the single-minded 2 gene (Sim2) show phenotypes similar to some of those present in the partial trisomy 16 mouse models of Down syndrome. *Hum Mol Genet* 9:1853-1864.
- Christie JM, Wenthold RJ, Monaghan DT (1999) Insulin causes a transient tyrosine phosphorylation of NR2A and NR2B NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *J Neurochem* 72:1523-1528.
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2172-2175.
- Ciabarra AM, Sullivan JM, Gahn LG, Pecht G, Heinemann S, Sevarino KA (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci* 15:6498-6508.
- Clark D, Wilson GN (2003) Behavioral assessment of children with Down syndrome using the Reiss psychopathology scale. *Am J Med Genet A* 118:210-216.
- Clark S, Schwalbe J, Stasko MR, Yarowsky PJ, Costa AC (2006) Fluoxetine rescues deficient neurogenesis in hippocampus of the Ts65Dn mouse model for Down syndrome. *Exp Neurol* 200:256-261.
- Cockrell AS, Kafri T (2007) Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Biotechnol* 36:184-204.
- Collins MO, Husi H, Yu L, Brandon JM, Anderson CN, Blackstock WP, Choudhary JS, Grant SG (2006) Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. *J Neurochem* 97 Suppl 1:16-23.
- Costa AC, Walsh K, Davisson MT (1999) Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome. *Physiol Behav* 68:211-220.

- Costa AC, Scott-McKean JJ, Stasko MR (2007) Acute Injections of the NMDA Receptor Antagonist Memantine Rescue Performance Deficits of the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome on a Fear Conditioning Test. *Neuropsychopharmacology*.
- Coussons-Read ME, Crnic LS (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 JT, Oster-Granite ML, Gearhart JD (1986) The neurobiologic consequences of Down syndrome. *Brain Res Bull* 16:773-787.
- Cucchiariini M, Ren XL, Perides G, Terwilliger EF (2003) Selective gene expression in brain microglia mediated via adeno-associated virus type 2 and type 5 vectors. *Gene Ther* 10:657-667.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327-335.
- Dalton AJ, Crapper-McLachlan DR (1986) Clinical expression of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Psychiatr Clin North Am* 9:659-670.
- Dang MT, Yokoi F, Yin HH, Lovinger DM, Wang Y, Li Y (2006) Disrupted motor learning and long-term synaptic plasticity in mice lacking NMDAR1 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15254-15259.
- Daoudal G, Debanne D (2003) Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. *Learn Mem* 10:456-465.
- Dauphinot L, Lyle R, Rivals I, Dang MT, Moldrich RX, Golfier G, Ettwiller L, Toyama K, Rossier J, Personnaz L, Antonarakis SE, Epstein CJ, Sinet PM, Potier MC (2005) The cerebellar transcriptome during postnatal development of the Ts1Cje mouse, a segmental trisomy model for Down syndrome. *Hum Mol Genet* 14:373-384.
- Davidson BL, Stein CS, Heth JA, Martins I, Kotin RM, Derksen TA, Zabner J, Ghodsi A, Chiorini JA (2000) Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3428-3432.
- Davisson MT, Schmidt C, Akeson EC (1990) Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 360:263-280.
- de Graaf K, Czajkowska H, Rottmann S, Packman LC, Lilischkis R, Luscher B, 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.
- de Graaf K, Hekerman P, Spelten O, Herrmann A, Packman LC, 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.
- Delabar JM, Theophile D, Rahmani Z, Chettouh Z, Blouin JL, Prieur M, Noel B, Sinet PM (1993) Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 1:114-124.
- Demas GE, Nelson RJ, Krueger BK, Yarowsky PJ (1998) Impaired spatial working and reference memory in segmental trisomy (Ts65Dn) mice. *Behav Brain Res* 90:199-201.
- Deng X, Ewton DZ, Pawlikowski B, Maimone M, Friedman E (2003) Mirk/dyrk1B is a Rho-induced kinase active in skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem* 278:41347-41354.
- Denovan-Wright EM, Rodriguez-Lebron E, Lewin AS, Mandel RJ (2008) Unexpected off-targeting effects of anti-huntingtin ribozymes and siRNA in vivo. *Neurobiol Dis* 29:446-455.
- Desai A, Turetsky D, Vasudevan K, Buonanno A (2002) Analysis of transcriptional regulatory sequences of the N-methyl-D-aspartate receptor 2A subunit gene in cultured cortical neurons and transgenic mice. *J Biol Chem* 277:46374-46384.

- Dierssen M, de Lagran MM (2006) DYRK1A (dual-specificity tyrosine-phosphorylated and -regulated kinase 1A): a gene with dosage effect during development and neurogenesis. *ScientificWorldJournal* 6:1911-1922.
- Dierssen M, Ortiz-Abalia J, Arque G, de Lagran MM, Fillat C (2006) Pitfalls and hopes in Down syndrome therapeutic approaches: in the search for evidence-based treatments. *Behav Genet* 36:454-468.
- Dierssen M, Vallina IF, Baamonde C, Garcia-Calatayud S, Lumbreras MA, 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, Estivill X (2001) Murine models for Down syndrome. *Physiol Behav* 73:859-871.
- Dorn G, Patel S, Wotherspoon G, Hemmings-Mieszczak M, Barclay J, Natt FJ, Martin P, Bevan S, Fox A, Ganju P, Wishart W, Hall J (2004) siRNA relieves chronic neuropathic pain. *Nucleic Acids Res* 32:e49.
- Douglas JT (2007) Adenoviral vectors for gene therapy. *Mol Biotechnol* 36:71-80.
- Dowjat WK, Adayev T, Kuchna I, Nowicki K, Palmieriello S, Hwang YW, Wegiel J (2007) Trisomy-driven overexpression of DYRK1A kinase in the brain of subjects with Down syndrome. *Neurosci Lett* 413:77-81.
- Dunah AW, Sirianni AC, Fienberg AA, Bastia E, Schwarzschild MA, Standaert DG (2004) Dopamine D1-dependent trafficking of striatal N-methyl-D-aspartate glutamate receptors requires Fyn protein tyrosine kinase but not DARPP-32. *Mol Pharmacol* 65:121-129.
- During MJ, Ashenden LM (1998) Towards gene therapy for the central nervous system. *Mol Med Today* 4:485-493.
- During MJ, Symes CW, Lawlor PA, Lin J, Dunning J, Fitzsimons HL, Poulsen D, Leone P, Xu R, Dicker BL, Lipski J, Young D (2000) An oral vaccine against NMDAR1 with efficacy in experimental stroke and epilepsy. *Science* 287:1453-1460.
- During MJ, Samulski RJ, Elsworth JD, Kaplitt MG, Leone P, Xiao X, Li J, Freese A, Taylor JR, Roth RH, Sladek JR, Jr., O'Malley KL, Redmond DE, Jr. (1998) In vivo expression of therapeutic human genes for dopamine production in the caudates of MPTP-treated monkeys using an AAV vector. *Gene Ther* 5:820-827.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188-200.
- Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T (2002) Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26:199-213.
- Elliger SS, Elliger CA, Aguilar CP, Raju NR, Watson GL (1999) Elimination of lysosomal storage in brains of MPS VII mice treated by intrathecal administration of an adeno-associated virus vector. *Gene Ther* 6:1175-1178.
- Ema M, Ikegami S, Hosoya T, Mimura J, Ohtani H, Nakao K, Inokuchi K, Katsuki M, Fujii-Kuriyama Y (1999) Mild impairment of learning and memory in mice overexpressing the mSim2 gene located on chromosome 16: an animal model of Down's syndrome. *Hum Mol Genet* 8:1409-1415.
- Epstein CJ (2002) 2001 William Allan Award Address. From Down syndrome to the "human" in "human genetics". *Am J Hum Genet* 70:300-313.
- Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Vallina IF, Baamonde C, Lumbreras MA, Dierssen M, Tobena A, Florez J (1995) A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neurosci Lett* 199:143-146.
- Escorihuela RM, Vallina IF, Martinez-Cue C, Baamonde C, Dierssen M, Tobena A, Florez J, Fernandez-Teruel A (1998) Impaired short- and long-term memory in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Neurosci Lett* 247:171-174.
- Eslamboli A (2005) Assessment of GDNF in primate models of Parkinson's disease: comparison with human studies. *Rev Neurosci* 16:303-310.

- Feigin A, Kaplitt MG, Tang C, Lin T, Mattis P, Dhawan V, During MJ, Eidelberg D (2007) Modulation of metabolic brain networks after subthalamic gene therapy for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19559-19564.
- Fernandez F, Morishita W, Zuniga E, Nguyen J, Blank M, Malenka RC, Garner CC (2007) Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome. *Nat Neurosci* 10:411-413.
- Ferrer I, Gullotta F (1990) Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta Neuropathol* 79:680-685.
- Ferrer I, Barrachina M, Puig B, Martinez de Lagran M, Marti E, Avila J, Dierssen M (2005) Constitutive Dyrk1A is abnormally expressed in Alzheimer disease, Down syndrome, Pick disease, and related transgenic models. *Neurobiol Dis* 20:392-400.
- Fidler DJ, Hodapp RM (1999) Craniofacial maturity and perceived personality in children with Down syndrome. *Am J Ment Retard* 104:410-421.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Fitzsimons HL, McKenzie JM, During MJ (2001) Insulators coupled to a minimal bidirectional tet cassette for tight regulation of rAAV-mediated gene transfer in the mammalian brain. *Gene Ther* 8:1675-1681.
- Forsayeth JR, Eberling JL, Sanftner LM, Zhen Z, Pivrotto P, Bringas J, Cunningham J, Bankiewicz KS (2006) A dose-ranging study of AAV-hAADC therapy in Parkinsonian monkeys. *Mol Ther* 14:571-577.
- Fotaki V, Martinez De Lagran M, Estivill X, Arbones M, Dierssen M (2004) Haploinsufficiency of Dyrk1A in mice leads to specific alterations in the development and regulation of motor activity. *Behav Neurosci* 118:815-821.
- Fotaki V, Dierssen M, Alcantara S, Martinez S, Marti E, Casas C, Visa J, Soriano E, Estivill X, Arbones ML (2002) Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Mol Cell Biol* 22:6636-6647.
- Fraldi A, Biffi A, Lombardi A, Visigalli I, Pepe S, Settembre C, Nusco E, Auricchio A, Naldini L, Ballabio A, Cosma MP (2007) SUMF1 enhances sulfatase activities in vivo in five sulfatase deficiencies. *Biochem J* 403:305-312.
- Frisella WA, O'Connor LH, Vogler CA, Roberts M, Walkley S, Levy B, Daly TM, Sands MS (2001) Intracranial injection of recombinant adeno-associated virus improves cognitive function in a murine model of mucopolysaccharidosis type VII. *Mol Ther* 3:351-358.
- Fujita Y, Katagi J, Tabuchi A, Tsuchiya T, Tsuda M (1999) Coactivation of secretogranin-II and BDNF genes mediated by calcium signals in mouse cerebellar granule cells. *Brain Res Mol Brain Res* 63:316-324.
- Fukuchi K, Tahara K, Kim HD, Maxwell JA, Lewis TL, Accavitti-Loper MA, Kim H, Ponnazhagan S, Lalonde R (2006) Anti-Abeta single-chain antibody delivery via adeno-associated virus for treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 23:502-511.
- Gahtan E, Auerbach JM, Groner Y, Segal M (1998) Reversible impairment of long-term potentiation in transgenic Cu/Zn-SOD mice. *Eur J Neurosci* 10:538-544.
- Gardiner K (2004) Gene-dosage effects in Down syndrome and trisomic mouse models. *Genome Biol* 5:244.
- Gerlai R, Roder J (1995) Abnormal exploratory behavior in transgenic mice carrying multiple copies of the human gene for S100 beta. *J Psychiatry Neurosci* 20:105-112.
- Golden JA, Hyman BT (1994) Development of the superior temporal neocortex is anomalous in trisomy 21. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:513-520.
- Gonzalez-Alegre P, Miller VM, Davidson BL, Paulson HL (2003) Toward therapy for DYT1 dystonia: allele-specific silencing of mutant TorsinA. *Ann Neurol* 53:781-787.

- Grillner S, Hellgren J, Menard A, Saitoh K, Wikstrom MA (2005) Mechanisms for selection of basic motor programs--roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci* 28:364-370.
- Grimm D, Kay MA (2007) Therapeutic application of RNAi: is mRNA targeting finally ready for prime time? *J Clin Invest* 117:3633-3641.
- Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441:537-541.
- Groenewegen HJ (2003) The basal ganglia and motor control. *Neural Plast* 10:107-120.
- Groner Y, Elroy-Stein O, Avraham KB, Schickler M, Knobler H, Minc-Golomb D, Bar-Peled O, Yarom R, Rotshenker S (1994) Cell damage by excess CuZnSOD and Down's syndrome. *Biomed Pharmacother* 48:231-240.
- Gropp A (1975) Proceedings: Hypoplasia and malformation in trisomy syndromes of the mouse foetus. *Mutat Res* 29:216.
- Grzelinski M, Urban-Klein B, Martens T, Lamszus K, Bakowsky U, Hobel S, Czubyko F, Aigner A (2006) RNA interference-mediated gene silencing of pleiotrophin through polyethylenimine-complexed small interfering RNAs in vivo exerts antitumoral effects in glioblastoma xenografts. *Hum Gene Ther* 17:751-766.
- 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 AM, Ashley J, Lovett M, Estivill X, Pritchard MA (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.
- Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, Okamura H, Bolton D, Feske S, Hogan PG, Rao A (2006) A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 441:646-650.
- Haberman RP, McCown TJ, Samulski RJ (1998) Inducible long-term gene expression in brain with adeno-associated virus gene transfer. *Gene Ther* 5:1604-1611.
- Haberman RP, Samulski RJ, McCown TJ (2003) Attenuation of seizures and neuronal death by adeno-associated virus vector galanin expression and secretion. *Nat Med* 9:1076-1080.
- Hadaczek P, Mirek H, Bringas J, Cunningham J, Bankiewicz K (2004) Basic fibroblast growth factor enhances transduction, distribution, and axonal transport of adeno-associated virus type 2 vector in rat brain. *Hum Gene Ther* 15:469-479.
- Haelewyn B, Freret T, Pacary E, Schumann-Bard P, Boulouard M, Bernaudin M, Bouet V (2007) Long-term evaluation of sensorimotor and mnemonic behaviour following striatal NMDA-induced unilateral excitotoxic lesion in the mouse. *Behav Brain Res* 178:235-243.
- Hallett PJ, Spoelgen R, Hyman BT, Standaert DG, Dunah AW (2006) Dopamine D1 activation potentiates striatal NMDA receptors by tyrosine phosphorylation-dependent subunit trafficking. *J Neurosci* 26:4690-4700.
- Hammerle B, Vera-Samper E, Speicher S, Arencibia R, Martinez S, Tejedor FJ (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, Tejedor FJ (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.
- Hammond C, Bergman H, Brown P (2007) Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *Trends Neurosci* 30:357-364.

- Hansel C, Linden DJ, D'Angelo E (2001) Beyond parallel fiber LTD: the diversity of synaptic and non-synaptic plasticity in the cerebellum. *Nat Neurosci* 4:467-475.
- Hara H, Monsonogo A, Yuasa K, Adachi K, Xiao X, Takeda S, Takahashi K, Weiner HL, Tabira T (2004) Development of a safe oral Abeta vaccine using recombinant adeno-associated virus vector for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 6:483-488.
- Harding TC, Dickinson PJ, Roberts BN, Yendluri S, Gonzalez-Edick M, Lecouteur RA, Jooss KU (2006) Enhanced gene transfer efficiency in the murine striatum and an orthotopic glioblastoma tumor model, using AAV-7- and AAV-8-pseudotyped vectors. *Hum Gene Ther* 17:807-820.
- Hardingham GE, Bading H (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 26:81-89.
- Harper SQ, Staber PD, He X, Eliason SL, Martins IH, Mao Q, Yang L, Kotin RM, Paulson HL, Davidson BL (2005) RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5820-5825.
- Harris-Cerruti C, Kamsler A, Kaplan B, Lamb B, Segal M, Groner Y (2004) Functional and morphological alterations in compound transgenic mice overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase and amyloid precursor protein [correction]. *Eur J Neurosci* 19:1174-1190.
- Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, Toyoda A, Ishii K, Totoki Y, Choi DK, 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 SE, 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 ML (2000) The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 405:311-319.
- Head E, Lott IT, Patterson D, Doran E, Haier RJ (2007) Possible compensatory events in adult Down syndrome brain prior to the development of Alzheimer disease neuropathology: targets for nonpharmacological intervention. *J Alzheimers Dis* 11:61-76.
- Heidel JD, Yu Z, Liu JY, Rele SM, Liang Y, Zeidan RK, Kornbrust DJ, Davis ME (2007) Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5715-5721.
- Heuer GG, Passini MA, Jiang K, Parente MK, Lee VM, Trojanowski JQ, Wolfe JH (2002) Selective neurodegeneration in murine mucopolysaccharidosis VII is progressive and reversible. *Ann Neurol* 52:762-770.
- Himpel S, Tegge W, Frank R, Leder S, Joost HG, Becker W (2000) Specificity determinants of substrate recognition by the protein kinase DYRK1A. *J Biol Chem* 275:2431-2438.
- Holmes KD, Mattar P, Marsh DR, Jordan V, Weaver LC, Dekaban GA (2002) The C-terminal C1 cassette of the N-methyl-D-aspartate receptor 1 subunit contains a bipartite nuclear localization sequence. *J Neurochem* 81:1152-1165.
- Holtzman DM, Santucci D, Kilbridge J, Chua-Couzens J, Fontana DJ, Daniels SE, Johnson RM, Chen K, Sun Y, Carlson E, Alleva E, Epstein CJ, Mobley WC (1996) Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13333-13338.

- Hommel JD, Sears RM, Georgescu D, Simmons DL, DiLeone RJ (2003) Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med* 9:1539-1544.
- Hook EB (1983) Down syndrome rates and relaxed selection at older maternal ages. *Am J Hum Genet* 35:1307-1313.
- Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougerolles A, Endres S, Hartmann G (2005) Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11:263-270.
- Huang Y, Chen-Hwang MC, Dolios G, Murakami N, Padovan JC, Wang R, Hwang YW (2004) Mnb/Dyrk1A phosphorylation regulates the interaction of dynamin 1 with SH3 domain-containing proteins. *Biochemistry* 43:10173-10185.
- Huesken D, Lange J, Mickanin C, Weiler J, Asselbergs F, Warner J, Meloon B, Engel S, Rosenberg A, Cohen D, Labow M, Reinhardt M, Natt F, Hall J (2005) Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. *Nat Biotechnol* 23:995-1001.
- Hunter CL, Bimonte-Nelson HA, Nelson M, Eckman CB, Granholm AC (2004) Behavioral and neurobiological markers of Alzheimer's disease in Ts65Dn mice: effects of estrogen. *Neurobiol Aging* 25:873-884.
- Ikonomidou C, Turski L (2002) Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol* 1:383-386.
- Insausti AM, Megias M, Crespo D, Cruz-Orive LM, Dierssen M, Vallina IF, Insausti R, Florez J (1998) Hippocampal volume and neuronal number in Ts65Dn mice: a murine model of Down syndrome. *Neurosci Lett* 253:175-178.
- Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L, Linsley PS (2006) Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *Rna* 12:1179-1187.
- Jacobs PA, Baikie AG, Court Brown WM, Strong JA (1959) The somatic chromosomes in mongolism. *Lancet* 1:710.
- Janssens N, Lesage AS (2001) Glutamate receptor subunit expression in primary neuronal and secondary glial cultures. *J Neurochem* 77:1457-1474.
- Jarabek BR, Yasuda RP, Wolfe BB (2004) Regulation of proteins affecting NMDA receptor-induced excitotoxicity in a Huntington's mouse model. *Brain* 127:505-516.
- Jernigan TL, Bellugi U (1990) Anomalous brain morphology on magnetic resonance images in Williams syndrome and Down syndrome. *Arch Neurol* 47:529-533.
- Jernigan TL, Bellugi U, Sowell E, Doherty S, Hesselink JR (1993) Cerebral morphologic distinctions between Williams and Down syndromes. *Arch Neurol* 50:186-191.
- Jiao J, Nakajima A, Janssen WG, Bindokas VP, Xiong X, Morrison JH, Brorson JR, Tang YP (2008) Expression of NR2B in Cerebellar Granule Cells Specifically Facilitates Effect of Motor Training on Motor Learning. *PLoS ONE* 3:e1684.
- Jin K, Park S, Ewton DZ, Friedman E (2007) The survival kinase Mirk/Dyrk1B is a downstream effector of oncogenic K-ras in pancreatic cancer. *Cancer Res* 67:7247-7255.
- Kadotani H, Hirano T, Masugi M, Nakamura K, Nakao K, Katsuki M, Nakanishi S (1996) Motor discoordination results from combined gene disruption of the NMDA receptor NR2A and NR2C subunits, but not from single disruption of the NR2A or NR2C subunit. *J Neurosci* 16:7859-7867.
- Kahlem P, Sultan M, Herwig R, Steinfath M, Balzereit D, Eppens B, Saran NG, Pletcher MT, South ST, Stetten G, Lehrach H, Reeves RH, Yaspo ML (2004) Transcript level alterations reflect gene dosage effects across multiple tissues in a mouse model of down syndrome. *Genome Res* 14:1258-1267.

- Kang JE, Choi SA, Park JB, Chung KC (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.
- Kaplitt MG, Leone P, Samulski RJ, Xiao X, Pfaff DW, O'Malley KL, During MJ (1994) Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet* 8:148-154.
- Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, Fitzsimons HL, Mattis P, Lawlor PA, Bland RJ, Young D, Strybing K, Eidelberg D, During MJ (2007) Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 369:2097-2105.
- Karadottir R, Cavellier P, Bergersen LH, Attwell D (2005) NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature* 438:1162-1166.
- Kaspar BK, Frost LM, Christian L, Umapathi P, Gage FH (2005) Synergy of insulin-like growth factor-1 and exercise in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57:649-655.
- Kells AP, Fong DM, Dragunow M, During MJ, Young D, Connor B (2004) AAV-mediated gene delivery of BDNF or GDNF is neuroprotective in a model of Huntington disease. *Mol Ther* 9:682-688.
- Kelly PA, 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.
- Kentrup H, Becker W, Heukelbach J, Wilmes A, Schurmann A, Huppertz C, Kainulainen H, Joost HG (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 DW, Kang J, Kim YJ, Choi SY, Hwang MK, Jeong BW, Kim GS, Joe CO, Chung SH, Song WJ (2004) Regulation of Dyrk1A kinase activity by 14-3-3. *Biochem Biophys Res Commun* 323:499-504.
- Kim EJ, Sung JY, Lee HJ, Rhim H, Hasegawa M, Iwatsubo T, Min do S, Kim J, Paik SR, Chung KC (2006) Dyrk1A phosphorylates alpha-synuclein and enhances intracellular inclusion formation. *J Biol Chem* 281:33250-33257.
- Kimura M (1995) Role of basal ganglia in behavioral learning. *Neurosci Res* 22:353-358.
- Kimura R, Kamino K, Yamamoto M, Nuripa A, Kida T, Kazui H, Hashimoto R, Tanaka T, Kudo T, Yamagata H, Tabara Y, Miki T, Akatsu H, Kosaka K, Funakoshi E, Nishitomi K, Sakaguchi G, Kato A, Hattori H, Uema T, Takeda M (2007) The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum Mol Genet* 16:15-23.
- Klein M, Pieri I, Uhlmann F, Pfizenmaier K, Eisel U (1998a) Cloning and characterization of promoter and 5'-UTR of the NMDA receptor subunit epsilon 2: evidence for alternative splicing of 5'-non-coding exon. *Gene* 208:259-269.
- Klein RC, Siarey RJ, Caruso A, Rapoport SI, Castellino FJ, Galdzicki Z (2001) Increased expression of NR2A subunit does not alter NMDA-evoked responses in cultured fetal trisomy 16 mouse hippocampal neurons. *J Neurochem* 76:1663-1669.
- Klein RL, Dayton RD, Tatom JB, Henderson KM, Henning PP (2008) AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: effects of serotype, promoter and purification method. *Mol Ther* 16:89-96.
- Klein RL, Hamby ME, Sonntag CF, Millard WJ, King MA, Meyer EM (2002) Measurements of vector-derived neurotrophic factor and green fluorescent protein levels in the brain. *Methods* 28:286-292.
- Klein RL, Meyer EM, Peel AL, Zolotukhin S, Meyers C, Muzyczka N, King MA (1998b) Neuron-specific transduction in the rat septohippocampal or nigrostriatal pathway by recombinant adeno-associated virus vectors. *Exp Neurol* 150:183-194.

- Kleschevnikov AM, Belichenko PV, Villar AJ, Epstein CJ, Malenka RC, Mobley WC (2004) Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome. *J Neurosci* 24:8153-8160.
- Klugmann M, Leichtlein CB, Symes CW, Serikawa T, Young D, During MJ (2005a) Restoration of aspartoacylase activity in CNS neurons does not ameliorate motor deficits and demyelination in a model of Canavan disease. *Mol Ther* 11:745-753.
- Klugmann M, Symes CW, Leichtlein CB, Klaussner BK, Dunning J, Fong D, Young D, During MJ (2005b) AAV-mediated hippocampal expression of short and long Homer 1 proteins differentially affect cognition and seizure activity in adult rats. *Mol Cell Neurosci* 28:347-360.
- Kohr G (2006) NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res* 326:439-446.
- Korenberg JR, Chen XN, Schipper R, Sun Z, Gonsky R, Gerwehr S, Carpenter N, Daumer C, Dignan P, Disteche C, et al. (1994) Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4997-5001.
- Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung KE, Kim MH, Davidson BL, Lee SK, Shankar P, Manjunath N (2007) Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448:39-43.
- Kurt MA, Kafa MI, Dierssen M, Davies DC (2004) Deficits of neuronal density in CA1 and synaptic density in the dentate gyrus, CA3 and CA1, in a mouse model of Down syndrome. *Brain Res* 1022:101-109.
- Kurt MA, Davies DC, Kidd M, Dierssen M, Florez J (2000) Synaptic deficit in the temporal cortex of partial trisomy 16 (Ts65Dn) mice. *Brain Res* 858:191-197.
- Lai SK, Tse YC, Yang MS, Wong CK, Chan YS, Yung KK (2003) Gene expression of glutamate receptors GluR1 and NR1 is differentially modulated in striatal neurons in rats after 6-hydroxydopamine lesion. *Neurochem Int* 43:639-653.
- Latash ML, Corcos DM (1991) Kinematic and electromyographic characteristics of single-joint movements of individuals with Down syndrome. *Am J Ment Retard* 96:189-201.
- Latash ML, Anson JG (2006) Synergies in health and disease: relations to adaptive changes in motor coordination. *Phys Ther* 86:1151-1160.
- Lejeune J, Turpin R, Gautier M (1959) [Mongolism; a chromosomal disease (trisomy)]. *Bull Acad Natl Med* 143:256-265.
- Levites Y, Jansen K, Smithson LA, Dakin R, Holloway VM, Das P, Golde TE (2006) Intracranial adeno-associated virus-mediated delivery of anti-pan amyloid beta, amyloid beta40, and amyloid beta42 single-chain variable fragments attenuates plaque pathology in amyloid precursor protein mice. *J Neurosci* 26:11923-11928.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15-20.
- Li XG, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Muramatsu C, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Nakano I, Ozawa K, Muramatsu S (2006) Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. *Mol Ther* 13:160-166.
- Lin EJ, Richichi C, Young D, Baer K, Vezzani A, During MJ (2003) Recombinant AAV-mediated expression of galanin in rat hippocampus suppresses seizure development. *Eur J Neurosci* 18:2087-2092.
- Lin JW, Wyszynski M, Madhavan R, Sealock R, Kim JU, Sheng M (1998) Yotiao, a novel protein of neuromuscular junction and brain that interacts with specific splice variants of NMDA receptor subunit NR1. *J Neurosci* 18:2017-2027.
- Liu L, Wong TP, Pozza MF, Lingenhoebl K, Wang Y, Sheng M, Auberson YP, Wang YT (2004) Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304:1021-1024.

- Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyakkers A, Liu L, Lai TW, Wu DC, Lu J, Tymianski M, Craig AM, Wang YT (2007) NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* 27:2846-2857.
- Llansola M, Sanchez-Perez A, Cauli O, Felipo V (2005) Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. 1. Properties of the NMDA receptor that modulate its function. *Cerebellum* 4:154-161.
- Lu Y (2004) Recombinant adeno-associated virus as delivery vector for gene therapy--a review. *Stem Cells Dev* 13:133-145.
- Lundstrom K (2007) Prospects of treating neurological diseases by gene therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 8:34-40.
- Luo J, Wang Y, Yasuda RP, Dunah AW, Wolfe BB (1997) The majority of N-methyl-D-aspartate receptor complexes in adult rat cerebral cortex contain at least three different subunits (NR1/NR2A/NR2B). *Mol Pharmacol* 51:79-86.
- Luo MC, Zhang DQ, Ma SW, Huang YY, Shuster SJ, Porreca F, Lai J (2005) An efficient intrathecal delivery of small interfering RNA to the spinal cord and peripheral neurons. *Mol Pain* 1:29.
- Lyle R, Gehrig C, Neergaard-Henrichsen C, Deutsch S, Antonarakis SE (2004) Gene expression from the aneuploid chromosome in a trisomy mouse model of down syndrome. *Genome Res* 14:1268-1274.
- Mandel RJ, Spratt SK, Snyder RO, Leff SE (1997) Midbrain injection of recombinant adeno-associated virus encoding rat glial cell line-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-induced degeneration model of Parkinson's disease in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14083-14088.
- Mandel RJ, Gage FH, Clevenger DG, Spratt SK, Snyder RO, Leff SE (1999) Nerve growth factor expressed in the medial septum following in vivo gene delivery using a recombinant adeno-associated viral vector protects cholinergic neurons from fimbria-fornix lesion-induced degeneration. *Exp Neurol* 155:59-64.
- Mao J, Maye P, Kogerman P, Tejedor FJ, Toftgard R, Xie W, Wu G, Wu D (2002) Regulation of Gli1 transcriptional activity in the nucleus by Dyrk1. *J Biol Chem* 277:35156-35161.
- Mao R, Zielke CL, Zielke HR, Pevsner J (2003) Global up-regulation of chromosome 21 gene expression in the developing Down syndrome brain. *Genomics* 81:457-467.
- 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.
- Marquez RT, McCaffrey AP (2007) Advances in MicroRNAs: Implications for Gene Therapists. *Hum Gene Ther*.
- Marsden CD, Obeso JA (1994) The functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease. *Brain* 117 (Pt 4):877-897.
- 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.
- Massey PV, Johnson BE, Moulton PR, Auberson YP, Brown MW, Molnar E, Collingridge GL, Bashir ZI (2004) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci* 24:7821-7828.

- Matalon R, Surendran S, Rady PL, Quast MJ, Campbell GA, Matalon KM, Tying SK, Wei J, Peden CS, Ezell EL, Muzyczka N, Mandel RJ (2003) Adeno-associated virus-mediated aspartoacylase gene transfer to the brain of knockout mouse for canavan disease. *Mol Ther* 7:580-587.
- Matsuda K, Kamiya Y, Matsuda S, Yuzaki M (2002) Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res Mol Brain Res* 100:43-52.
- Matsuo R, Ochiai W, Nakashima K, 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.
- McBride JL, During MJ, Wu J, Chen EY, Leurgans SE, Kordower JH (2003) Structural and functional neuroprotection in a rat model of Huntington's disease by viral gene transfer of GDNF. *Exp Neurol* 181:213-223.
- McCarty DM, Fu H, Monahan PE, Toulson CE, Naik P, Samulski RJ (2003) Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* 10:2112-2118.
- McCown TJ, Xiao X, Li J, Breese GR, Samulski RJ (1996) Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus (AAV) vector. *Brain Res* 713:99-107.
- McIlhinney RA, Le Bourdelles B, Molnar E, Tricaud N, Streit P, Whiting PJ (1998) Assembly intracellular targeting and cell surface expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1a and NR2A in transfected cells. *Neuropharmacology* 37:1355-1367.
- McManus MT, Sharp PA (2002) Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 3:737-747.
- McPhee SW, Francis J, Janson CG, Serikawa T, Hyland K, Ong EO, Raghavan SS, Freese A, Leone P (2005) Effects of AAV-2-mediated aspartoacylase gene transfer in the tremor rat model of Canavan disease. *Brain Res Mol Brain Res* 135:112-121.
- McPhee SW, Janson CG, Li C, Samulski RJ, Camp AS, Francis J, Shera D, Lioutermann L, Feely M, Freese A, Leone P (2006) Immune responses to AAV in a phase I study for Canavan disease. *J Gene Med* 8:577-588.
- Metzler M, Gan L, Wong TP, Liu L, Helm J, Georgiou J, Wang Y, Bissada N, Cheng K, Roder JC, Wang YT, Hayden MR (2007) NMDA receptor function and NMDA receptor-dependent phosphorylation of huntingtin is altered by the endocytic protein HIP1. *J Neurosci* 27:2298-2308.
- Miller TM, Kaspar BK, Kops GJ, Yamanaka K, Christian LJ, Gage FH, Cleveland DW (2005) Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57:773-776.
- Miller VM, Xia H, Marrs GL, Gouvion CM, Lee G, Davidson BL, Paulson HL (2003) Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7195-7200.
- Mingozzi F, Maus MV, Hui DJ, Sabatino DE, Murphy SL, Rasko JE, Ragni MV, Manno CS, Sommer J, Jiang H, Pierce GF, Ertl HC, High KA (2007) CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med* 13:419-422.
- Mody I, MacDonald JF (1995) NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca²⁺ release. *Trends Pharmacol Sci* 16:356-359.
- Montgomery JM, Selcher JC, Hanson JE, Madison DV (2005) Dynamin-dependent NMDAR endocytosis during LTD and its dependence on synaptic state. *BMC Neurosci* 6:48.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.

- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256:1217-1221.
- Morishita W, Lu W, Smith GB, Nicoll RA, Bear MF, Malenka RC (2007) Activation of NR2B-containing NMDA receptors is not required for NMDA receptor-dependent long-term depression. *Neuropharmacology* 52:71-76.
- Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354:31-37.
- Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, Blanchard K, Jensen K, Breen W, Hartsough K, Machemer L, Radka S, Jadhav V, Vaish N, Zinnen S, Vargeese C, Bowman K, Shaffer CS, Jeffs LB, Judge A, MacLachlan I, Polisky B (2005) Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 23:1002-1007.
- Murakami N, Xie W, Lu RC, Chen-Hwang MC, Wieraszko A, Hwang YW (2006) Phosphorylation of amphiphysin I by minibrain kinase/dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase, a kinase implicated in Down syndrome. *J Biol Chem* 281:23712-23724.
- Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Shizuma N, Kawasaki K, Ono F, Shen Y, Wang L, Mizukami H, Kume A, Matsumura M, Nagatsu I, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Terao K, Nakano I, Ozawa K (2002) Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum Gene Ther* 13:345-354.
- Nadel L (2003) Down's syndrome: a genetic disorder in biobehavioral perspective. *Genes Brain Behav* 2:156-166.
- Nakanishi S, Okazawa M (2006) Membrane potential-regulated Ca²⁺ signalling in development and maturation of mammalian cerebellar granule cells. *J Physiol* 575:389-395.
- Nakano K, Kayahara T, Tsutsumi T, Ushiro H (2000) Neural circuits and functional organization of the striatum. *J Neurol* 247 Suppl 5:V1-15.
- Nicholls DG (2004) Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Curr Mol Med* 4:149-177.
- Nicholls DG, Ward MW (2000) Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci* 23:166-174.
- Nishi M, Hinds H, Lu HP, Kawata M, Hayashi Y (2001) Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci* 21:RC185.
- Nissen RM, Amsterdam A, Hopkins N (2006) A zebrafish screen for craniofacial mutants identifies *wdr68* as a highly conserved gene required for endothelin-1 expression. *BMC Dev Biol* 6:28.
- Nong Y, Huang YQ, Ju W, Kalia LV, Ahmadian G, Wang YT, Salter MW (2003) Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature* 422:302-307.
- Okabe S, Collin C, Auerbach JM, Meiri N, Bengzon J, Kennedy MB, Segal M, McKay RD (1998) Hippocampal synaptic plasticity in mice overexpressing an embryonic subunit of the NMDA receptor. *J Neurosci* 18:4177-4188.
- Okui M, Ide T, Morita K, Funakoshi E, Ito F, Ogita K, Yoneda Y, Kudoh J, Shimizu N (1999) High-level expression of the *Mnb/Dyrk1A* gene in brain and heart during rat early development. *Genomics* 62:165-171.
- Olson LE, Roper RJ, Baxter LL, Carlson EJ, Epstein CJ, Reeves RH (2004) Down syndrome mouse models Ts65Dn, Ts1Cje, and Ms1Cje/Ts65Dn exhibit variable severity of cerebellar phenotypes. *Dev Dyn* 230:581-589.
- Olson LE, Roper RJ, Sengstaken CL, Peterson EA, Aquino V, Galdzicki Z, Siarey R, Pletnikov M, Moran TH, Reeves RH (2007) Trisomy for the Down syndrome

- 'critical region' is necessary but not sufficient for brain phenotypes of trisomic mice. *Hum Mol Genet* 16:774-782.
- O'Reilly M, Palfi A, Chadderton N, Millington-Ward S, Ader M, Cronin T, Tuohy T, Auricchio A, Hildinger M, Tivnan A, McNally N, Humphries MM, Kiang AS, Humphries P, Kenna PF, Farrar GJ (2007) RNA interference-mediated suppression and replacement of human rhodopsin in vivo. *Am J Hum Genet* 81:127-135.
- Ornstein L (1964) Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci* 121:321-349.
- Ozawa K, Fan DS, Shen Y, Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Ogawa M, Urabe M, Kume A, Nakano I (2000) Gene therapy of Parkinson's disease using adeno-associated virus (AAV) vectors. *J Neural Transm Suppl*:181-191.
- Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS (2002) Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16:948-958.
- Papadia S, Hardingham GE (2007) The dichotomy of NMDA receptor signaling. *Neuroscientist* 13:572-579.
- Park J, Yang EJ, Yoon JH, Chung KC (2007) Dyrk1A overexpression in immortalized hippocampal cells produces the neuropathological features of Down syndrome. *Mol Cell Neurosci* 36:270-279.
- Parsons CG, Stoffer A, Danysz W (2007) Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology* 53:699-723.
- Passini MA, Wolfe JH (2001) Widespread gene delivery and structure-specific patterns of expression in the brain after intraventricular injections of neonatal mice with an adeno-associated virus vector. *J Virol* 75:12382-12392.
- Passini MA, Watson DJ, Vite CH, Landsburg DJ, Feigenbaum AL, Wolfe JH (2003) Intraventricular brain injection of adeno-associated virus type 1 (AAV1) in neonatal mice results in complementary patterns of neuronal transduction to AAV2 and total long-term correction of storage lesions in the brains of beta-glucuronidase-deficient mice. *J Virol* 77:7034-7040.
- Pfeifer A, Eigenbrod S, Al-Khadra S, Hofmann A, Mitteregger G, Moser M, Bertsch U, Kretzschmar H (2006) Lentivector-mediated RNAi efficiently suppresses prion protein and prolongs survival of scrapie-infected mice. *J Clin Invest* 116:3204-3210.
- Pinter JD, Eliez S, Schmitt JE, Capone GT, Reiss AL (2001a) Neuroanatomy of Down's syndrome: a high-resolution MRI study. *Am J Psychiatry* 158:1659-1665.
- Pinter JD, Brown WE, Eliez S, Schmitt JE, Capone GT, Reiss AL (2001b) Amygdala and hippocampal volumes in children with Down syndrome: a high-resolution MRI study. *Neurology* 56:972-974.
- Popescu AT, Saghyan AA, Pare D (2007) NMDA-dependent facilitation of corticostriatal plasticity by the amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:341-346.
- Prandini P, Deutsch S, Lyle R, Gagnebin M, Delucinge Vivier C, Delorenzi M, Gehrig C, Descombes P, Sherman S, Dagna Bricarelli F, Baldo C, Novelli A, Dallapiccola B, Antonarakis SE (2007) Natural gene-expression variation in Down syndrome modulates the outcome of gene-dosage imbalance. *Am J Hum Genet* 81:252-263.
- Prybylowski K, Fu Z, Losi G, Hawkins LM, Luo J, Chang K, Wenthold RJ, Vicini S (2002) Relationship between availability of NMDA receptor subunits and their expression at the synapse. *J Neurosci* 22:8902-8910.
- Pueschel SM, Bernier JC, Pezzullo JC (1991) Behavioural observations in children with Down's syndrome. *J Ment Defic Res* 35 (Pt 6):502-511.
- Purpura DP (1974) Dendritic spine "dysgenesis" and mental retardation. *Science* 186:1126-1128.

- Rachidi M, Lopes C (2007) Mental retardation and associated neurological dysfunctions in Down syndrome: A consequence of dysregulation in critical chromosome 21 genes and associated molecular pathways. *Eur J Paediatr Neurol*.
- Rahmani Z, Blouin JL, Creau-Goldberg N, Watkins PC, Mattei JF, Poissonnier M, Prieur M, Chettouh Z, Nicole A, Aurias A, 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 GS, Radcliffe PA, Day DM, Carthy JM, Leroux MA, Lee DC, Wong LF, Bilsland LG, Greensmith L, Kingsman SM, Mitrophanous KA, Mazarakis ND, Azzouz M (2005) Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 11:429-433.
- Rani S, Qiang M, Ticku MK (2005) Potential Role of CREB in Ethanol-induced NR2B Gene Transcription in Fetal Mouse Cortical Cells. *Mol Pharmacol*.
- Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun JC, Guillot S, Haase G, Szulc J, Henderson CE, 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.
- Ravenscroft P, Brotchie J (2000) NMDA receptors in the basal ganglia. *J Anat* 196 (Pt 4):577-585.
- Raz N, Torres IJ, Briggs SD, Spencer WD, Thornton AE, Loken WJ, Gunning FM, McQuain JD, Driesen NR, Acker JD (1995) Selective neuroanatomic abnormalities in Down's syndrome and their cognitive correlates: evidence from MRI morphometry. *Neurology* 45:356-366.
- Reeves RH, Irving NG, Moran TH, Wohn A, Kitt C, Sisodia SS, Schmidt C, Bronson RT, Davisson MT (1995) A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat Genet* 11:177-184.
- Rehman KK, Wang Z, Bottino R, Balamurugan AN, Trucco M, Li J, Xiao X, Robbins PD (2005) Efficient gene delivery to human and rodent islets with double-stranded (ds) AAV-based vectors. *Gene Ther* 12:1313-1323.
- Richichi C, Lin EJ, Stefanin D, Colella D, Ravizza T, Grignaschi G, Veglianesi P, Sperk G, During MJ, Vezzani A (2004) Anticonvulsant and antiepileptogenic effects mediated by adeno-associated virus vector neuropeptide Y expression in the rat hippocampus. *J Neurosci* 24:3051-3059.
- Richtsmeier JT, Baxter LL, Reeves RH (2000) Parallels of craniofacial maldevelopment in Down syndrome and Ts65Dn mice. *Dev Dyn* 217:137-145.
- Risser D, Lubec G, Cairns N, Herrera-Marschitz M (1997) Excitatory amino acids and monoamines in parahippocampal gyrus and frontal cortical pole of adults with Down syndrome. *Life Sci* 60:1231-1237.
- Rodriguez-Lebron E, Denovan-Wright EM, Nash K, Lewin AS, Mandel RJ (2005) Intrastratial rAAV-mediated delivery of anti-huntingtin shRNAs induces partial reversal of disease progression in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. *Mol Ther* 12:618-633.
- Roper RJ, Baxter LL, Saran NG, Klinedinst DK, Beachy PA, Reeves RH (2006) Defective cerebellar response to mitogenic Hedgehog signaling in Down [corrected] syndrome mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1452-1456.
- Rueda N, Florez J, Martinez-Cue C (2008a) Chronic pentylentetrazole but not donepezil treatment rescues spatial cognition in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Neurosci Lett* 433:22-27.
- Rueda N, Florez J, Martinez-Cue C (2008b) Effects of chronic administration of SGS-111 during adulthood and during the pre- and post-natal periods on the cognitive deficits of Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Behav Brain Res* 188:355-367.

- Rueda N, Mostany R, Pazos A, Florez J, Martinez-Cue C (2005) Cell proliferation is reduced in the dentate gyrus of aged but not young Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Neurosci Lett* 380:197-201.
- Rumble B, Retallack R, Hilbich C, Simms G, Multhaup G, Martins R, Hockey A, Montgomery P, Beyreuther K, Masters CL (1989) Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 320:1446-1452.
- Ryoo SR, Jeong HK, Radnaabazar C, Yoo JJ, Cho HJ, Lee HW, Kim IS, Cheon YH, Ahn YS, Chung SH, Song WJ (2007) DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of Tau. A functional link between Down syndrome and Alzheimer disease. *J Biol Chem* 282:34850-34857.
- Sagazio A, Xiao X, Wang Z, Martari M, Salvatori R (2008) A single injection of double-stranded adeno-associated viral vector expressing GH normalizes growth in GH-deficient mice. *J Endocrinol* 196:79-88.
- Sago H, Carlson EJ, Smith DJ, Rubin EM, Crnic LS, Huang TT, Epstein CJ (2000) Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome. *Pediatr Res* 48:606-613.
- Sago H, Carlson EJ, Smith DJ, Kilbridge J, Rubin EM, Mobley WC, Epstein CJ, Huang TT (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 Y, Tsuzuki K, Yamada N, Okado H, Miwa A, Goto F, Ozawa S (2003) Transfer of NMDAR2 cDNAs increases endogenous NMDAR1 protein and induces expression of functional NMDA receptors in PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 110:159-168.
- Salehi A, Delcroix JD, Belichenko PV, Zhan K, Wu C, Valletta JS, Takimoto-Kimura R, Kleschevnikov AM, Sambamurti K, Chung PP, Xia W, Villar A, Campbell WA, Kulnane LS, Nixon RA, Lamb BT, Epstein CJ, Stokin GB, Goldstein LS, Mobley WC (2006) Increased App expression in a mouse model of Down's syndrome disrupts NGF transport and causes cholinergic neuron degeneration. *Neuron* 51:29-42.
- Sanchez-Perez A, Llansola M, Cauli O, Felipe V (2005) Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. II. Signaling pathways and physiological modulators regulating NMDA receptor function. *Cerebellum* 4:162-170.
- Sanftner LM, Suzuki BM, Doroudchi MM, Feng L, McClelland A, Forsayeth JR, Cunningham J (2004) Striatal delivery of rAAV-hAADC to rats with preexisting immunity to AAV. *Mol Ther* 9:403-409.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.
- Sapru MK, Yates JW, Hogan S, Jiang L, Halter J, Bohn MC (2006) Silencing of human alpha-synuclein in vitro and in rat brain using lentiviral-mediated RNAi. *Exp Neurol* 198:382-390.
- Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Das S, Cui J, Talantova MV, Wong HK, Gong X, Chan SF, Zhang D, Nakanishi N, Sucher NJ, Lipton SA (2002) Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *J Neurophysiol* 87:2052-2063.
- Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M (1999) Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science* 284:1845-1848.
- Schlett K, Pieri I, Metzger F, Marchetti L, Steigerwald F, Dere E, Kirilly D, Tarnok K, Barabas B, Varga AK, Gerspach J, Huston J, Pfizenmaier K, Kohr G, Eisel UL (2004) Long-term NR2B expression in the cerebellum alters granule cell development and leads to NR2A down-regulation and motor deficits. *Mol Cell Neurosci* 27:215-226.

- Schneider C, Risser D, Kirchner L, Kitzmuller E, Cairns N, Prast H, Singewald N, Lubec G (1997) Similar deficits of central histaminergic system in patients with Down syndrome and Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 222:183-186.
- Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, Benz CC (2007) Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem* 282:1479-1486.
- Seregaza Z, Roubertoux PL, Jamon M, Soumireu-Mourat B (2006) Mouse models of cognitive disorders in trisomy 21: a review. *Behav Genet* 36:387-404.
- Sferra TJ, Qu G, McNeely D, Rennard R, Clark KR, Lo WD, Johnson PR (2000) Recombinant adeno-associated virus-mediated correction of lysosomal storage within the central nervous system of the adult mucopolysaccharidosis type VII mouse. *Hum Gene Ther* 11:507-519.
- Shapiro BL (1999) The Down syndrome critical region. *J Neural Transm Suppl* 57:41-60.
- Shevtsova Z, Malik JM, Michel U, Bahr M, Kugler S (2005) Promoters and serotypes: targeting of adeno-associated virus vectors for gene transfer in the rat central nervous system in vitro and in vivo. *Exp Physiol* 90:53-59.
- 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. *Biochem Biophys Res Commun* 225:92-99.
- Shukkur EA, Shimohata A, Akagi T, Yu W, Yamaguchi M, Murayama M, Chui D, Takeuchi T, Amano K, Subramhanya KH, Hashikawa T, Sago H, Epstein CJ, Takashima A, Yamakawa K (2006) Mitochondrial dysfunction and tau hyperphosphorylation in Ts1Cje, a mouse model for Down syndrome. *Hum Mol Genet* 15:2752-2762.
- Siarey RJ, Stoll J, Rapoport SI, Galdzicki Z (1997) Altered long-term potentiation in the young and old Ts65Dn mouse, a model for Down Syndrome. *Neuropharmacology* 36:1549-1554.
- Siarey RJ, Villar AJ, Epstein CJ, Galdzicki Z (2005) Abnormal synaptic plasticity in the Ts1Cje segmental trisomy 16 mouse model of Down syndrome. *Neuropharmacology* 49:122-128.
- Siarey RJ, Carlson EJ, Epstein CJ, Balbo A, Rapoport SI, Galdzicki Z (1999) Increased synaptic depression in the Ts65Dn mouse, a model for mental retardation in Down syndrome. *Neuropharmacology* 38:1917-1920.
- Singer O, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Coufal NG, Gage FH, Verma IM, Masliah E (2005) Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci* 8:1343-1349.
- Sitz JH, Tigges M, Baumgartel K, Khaspekov LG, Lutz B (2004) Dyrk1A potentiates steroid hormone-induced transcription via the chromatin remodeling factor Arip4. *Mol Cell Biol* 24:5821-5834.
- Skorupa AF, Fisher KJ, Wilson JM, Parente MK, Wolfe JH (1999) Sustained production of beta-glucuronidase from localized sites after AAV vector gene transfer results in widespread distribution of enzyme and reversal of lysosomal storage lesions in a large volume of brain in mucopolysaccharidosis VII mice. *Exp Neurol* 160:17-27.
- Skurat AV, Dietrich AD (2004) Phosphorylation of Ser640 in muscle glycogen synthase by DYRK family protein kinases. *J Biol Chem* 279:2490-2498.
- Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5:834-839.
- Smith DJ, Zhu Y, Zhang J, Cheng JF, Rubin EM (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.
- Sobolevsky AI, Rooney L, Wollmuth LP (2002) Staggering of subunits in NMDAR channels. *Biophys J* 83:3304-3314.

- Sondhi D, Peterson DA, Giannaris EL, Sanders CT, Mendez BS, De B, Rostkowski AB, Blanchard B, Bjugstad K, Sladek JR, Jr., Redmond DE, Jr., Leopold PL, Kaminsky SM, Hackett NR, Crystal RG (2005) AAV2-mediated CLN2 gene transfer to rodent and non-human primate brain results in long-term TPP-I expression compatible with therapy for LINCL. *Gene Ther* 12:1618-1632.
- Song WJ, Sternberg LR, Kasten-Sportes C, Keuren ML, Chung SH, Slack AC, Miller DE, Glover TW, Chiang PW, Lou L, Kurnit DM (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.
- Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Kotliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432:173-178.
- Standley S, Roche KW, McCallum J, Sans N, Wenthold RJ (2000) PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* 28:887-898.
- Stores R, Stores G, Fellows B, Buckley S (1998) Daytime behaviour problems and maternal stress in children with Down's syndrome, their siblings, and non-intellectually disabled and other intellectually disabled peers. *J Intellect Disabil Res* 42 (Pt 3):228-237.
- Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC (2002) A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5515-5520.
- Sultan M, Piccini I, Balzereit D, Herwig R, Saran NG, Lehrach H, Reeves RH, Yaspo ML (2007) Gene expression variation in Down's syndrome mice allows prioritization of candidate genes. *Genome Biol* 8:R91.
- Sumarsono SH, Wilson TJ, Tymms MJ, Venter DJ, Corrick CM, Kola R, Lahoud MH, Papas TS, Seth A, Kola I (1996) Down's syndrome-like skeletal abnormalities in *Ets2* transgenic mice. *Nature* 379:534-537.
- Sussan TE, Yang A, Li F, Ostrowski MC, Reeves RH (2008) Trisomy represses *Apc(Min)*-mediated tumours in mouse models of Down's syndrome. *Nature* 451:73-75.
- Szczesniak AM, Gilbert RW, Mukhida M, Anderson GI (2005) Mechanical loading modulates glutamate receptor subunit expression in bone. *Bone* 37:63-73.
- Tachibana Y, Kita H, Chiken S, Takada M, Nambu A (2008) Motor cortical control of internal pallidal activity through glutamatergic and GABAergic inputs in awake monkeys. *Eur J Neurosci* 27:238-253.
- Takahashi T, Feldmeyer D, Suzuki N, Onodera K, Cull-Candy SG, Sakimura K, Mishina M (1996) Functional correlation of NMDA receptor epsilon subunits expression with the properties of single-channel and synaptic currents in the developing cerebellum. *J Neurosci* 16:4376-4382.
- Takashima S, Ieshima A, Nakamura H, Becker LE (1989) Dendrites, dementia and the Down syndrome. *Brain Dev* 11:131-133.
- Takashima S, Iida K, Mito T, Arima M (1994) Dendritic and histochemical development and ageing in patients with Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res* 38 (Pt 3):265-273.
- Tan PH, Yang LC, Shih HC, Lan KC, Cheng JT (2005) Gene knockdown with intrathecal siRNA of NMDA receptor NR2B subunit reduces formalin-induced nociception in the rat. *Gene Ther* 12:59-66.
- Tang MX, Redemann CT, Szoka FC, Jr. (1996) In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug Chem* 7:703-714.

- Taymans JM, Vandenberghe LH, Haute CV, Thiry I, Deroose CM, Mortelmans L, Wilson JM, Debyser Z, Baekelandt V (2007) Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Hum Gene Ther* 18:195-206.
- Teipel SJ, Schapiro MB, Alexander GE, Krasuski JS, Horwitz B, Hoehne C, Moller HJ, Rapoport SI, 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 XR, Kaltenbach E, Ackermann A, Baumann A, Canal I, Heisenberg M, Fischbach KF, Pongs O (1995) minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* 14:287-301.
- Tenenbaum L, Jurysta F, Stathopoulos A, Puschban Z, Melas C, Hermens WT, Verhaagen J, Pichon B, Velu T, Levivier M (2000) Tropism of AAV-2 vectors for neurons of the globus pallidus. *Neuroreport* 11:2277-2283.
- Thakker DR, Natt F, Husken D, Maier R, Muller M, van der Putten H, Hoyer D, Cryan JF (2004) Neurochemical and behavioral consequences of widespread gene knockdown in the adult mouse brain by using nonviral RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17270-17275.
- Tomizawa K, Sunada S, Lu YF, Oda Y, Kinuta M, Ohshima T, Saito T, Wei FY, Matsushita M, Li ST, Tsutsui K, Hisanaga S, Mikoshiba K, Takei K, Matsui H (2003) Cophosphorylation of amphiphysin I and dynamin I by Cdk5 regulates clathrin-mediated endocytosis of synaptic vesicles. *J Cell Biol* 163:813-824.
- Tuneva EO, Bychkova ON, Boldyrev AA (2003) Effect of NMDA on production of reactive oxygen species by human lymphocytes. *Bull Exp Biol Med* 136:159-161.
- Ulbricht U, Eckerich C, Fillbrandt R, Westphal M, Lamszus K (2006) RNA interference targeting protein tyrosine phosphatase zeta/receptor-type protein tyrosine phosphatase beta suppresses glioblastoma growth in vitro and in vivo. *J Neurochem* 98:1497-1506.
- Van den Buuse M, Garner B, Koch M (2003) Neurodevelopmental animal models of schizophrenia: effects on prepulse inhibition. *Curr Mol Med* 3:459-471.
- van Es S, Weening KE, Devreotes PN (2001) The protein kinase YAKA regulates g-protein-linked signaling responses during growth and development of *Dictyostelium*. *J Biol Chem* 276:30761-30765.
- Vicari S (2006) Motor development and neuropsychological patterns in persons with Down syndrome. *Behav Genet* 36:355-364.
- Villmann C, Becker CM (2007) On the hypes and falls in neuroprotection: targeting the NMDA receptor. *Neuroscientist* 13:594-615.
- von Groote-Bidlingmaier F, Schmoll D, Orth HM, Joost HG, Becker W, 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 MR, Kostovic I (2002) Perinatal growth of prefrontal layer III pyramids in Down syndrome. *Pediatr Neurol* 27:36-38.
- Wang C, Wang CM, Clark KR, Sferra TJ (2003a) Recombinant AAV serotype 1 transduction efficiency and tropism in the murine brain. *Gene Ther* 10:1528-1534.
- Wang CY, Guo HY, Lim TM, Ng YK, Neo HP, Hwang PY, Yee WC, Wang S (2005) Improved neuronal transgene expression from an AAV-2 vector with a hybrid CMV enhancer/PDGFB-beta promoter. *J Gene Med* 7:945-955.
- Wang LJ, Lu YY, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Nagatsu T, Ozawa K, Nakano I (2002) Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 22:6920-6928.
- Wang PP, Doherty S, Hesselink JR, Bellugi U (1992) Callosal morphology concurs with neurobehavioral and neuropathological findings in two neurodevelopmental disorders. *Arch Neurol* 49:407-411.

- Wang WW, Cao R, Rao ZR, Chen LW (2004) Differential expression of NMDA and AMPA receptor subunits in DARPP-32-containing neurons of the cerebral cortex, hippocampus and neostriatum of rats. *Brain Res* 998:174-183.
- Wang Z, Ma HI, Li J, Sun L, Zhang J, Xiao X (2003b) Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther* 10:2105-2111.
- Warrington KH, Jr., Herzog RW (2006) Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer. *Hum Genet* 119:571-603.
- Waxman EA, Lynch DR (2005) N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. *Neuroscientist* 11:37-49.
- Wegiel J, Kuchna I, Nowicki K, Frackowiak J, Dowjat K, Silverman WP, Reisberg B, DeLeon M, Wisniewski T, Adayev T, Chen-Hwang MC, Hwang YW (2004) Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain. *Brain Res* 1010:69-80.
- Weis S, Weber G, Neuhold A, Rett A (1991) Down syndrome: MR quantification of brain structures and comparison with normal control subjects. *AJNR Am J Neuroradiol* 12:1207-1211.
- Weitlauf C, Honse Y, Auberson YP, Mishina M, Lovinger DM, Winder DG (2005) Activation of NR2A-containing NMDA receptors is not obligatory for NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *J Neurosci* 25:8386-8390.
- 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 Suppl*:59-70.
- Wickens JR, Budd CS, Hyland BI, Arbuthnott GW (2007) Striatal contributions to reward and decision making: making sense of regional variations in a reiterated processing matrix. *Ann N Y Acad Sci* 1104:192-212.
- Wisniewski KE (1990) Down syndrome children often have brain with maturation delay, retardation of growth, and cortical dysgenesis. *Am J Med Genet Suppl* 7:274-281.
- Wisniewski KE, Schmidt-Sidor B (1989) Postnatal delay of myelin formation in brains from Down syndrome infants and children. *Clin Neuropathol* 8:55-62.
- Wisniewski KE, Bobinski M (1991) Hypothalamic abnormalities in Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 373:153-167.
- Woods YL, Cohen P, Becker W, Jakes R, Goedert M, Wang X, Proud CG (2001) 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.
- Wu Z, Asokan A, Samulski RJ (2006) Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 14:316-327.
- Xia CF, Zhang Y, Boado RJ, Pardridge WM (2007) Intravenous siRNA of brain cancer with receptor targeting and avidin-biotin technology. *Pharm Res* 24:2309-2316.
- Xia H, Mao Q, Eliason SL, Harper SQ, Martins IH, Orr HT, Paulson HL, Yang L, Kotin RM, Davidson BL (2004) RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 10:816-820.
- Xia X, Zhou H, Huang Y, Xu Z (2006) Allele-specific RNAi selectively silences mutant SOD1 and achieves significant therapeutic benefit in vivo. *Neurobiol Dis* 23:578-586.
- Xu R, Janson CG, Mastakov M, Lawlor P, Young D, Mouravlev A, Fitzsimons H, Choi KL, Ma H, Dragunow M, Leone P, Chen Q, Dicker B, During MJ (2001) Quantitative comparison of expression with adeno-associated virus (AAV-2) brain-specific gene cassettes. *Gene Ther* 8:1323-1332.
- Yang EJ, Ahn YS, Chung KC (2001) Protein kinase Dyrk1 activates cAMP response element-binding protein during neuronal differentiation in hippocampal progenitor cells. *J Biol Chem* 276:39819-39824.

-
- Yates CM, Simpson J, Gordon A, Maloney AF, Allison Y, Ritchie IM, Urquhart A (1983) Catecholamines and cholinergic enzymes in pre-senile and senile Alzheimer-type dementia and Down's syndrome. *Brain Res* 280:119-126.**
- Yee BK, Chang T, Pietropaolo S, Feldon J (2005) The expression of prepulse inhibition of the acoustic startle reflex as a function of three pulse stimulus intensities, three prepulse stimulus intensities, and three levels of startle responsiveness in C57BL/6/J mice. *Behav Brain Res* 163:265-276.**
- Zhang B, Farwell MA (2007) microRNAs: a new emerging class of players for disease diagnostics and gene therapy. *J Cell Mol Med*.**
- Zhang Y, Zhang YF, Bryant J, Charles A, Boado RJ, Pardridge WM (2004) Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin Cancer Res* 10:3667-3677.**

ANEXO

Dierssen M, Ortiz-Abalia J, Arqué G, de Lagrán MM, Fillat C.
[*Pitfalls and hopes in Down syndrome therapeutic approaches:
in the search for evidence-based treatments.*](#)
Behav Genet. 2006 May;36(3):454-68. Epub 2006 Mar 7.

Altafaj X, Ortiz-Abalia J, Fernández M, Potier MC, Laffaire J, Andreu N, Dierssen M, González-García C, Ceña V, Martí E, Fillat C.

[Increased NR2A expression and prolonged decay of NMDA-induced calcium transient in cerebellum of TgDyrk1A mice, a mouse model of Down syndrome.](#)

Neurobiol Dis. 2008 Dec;32(3):377-84. Epub 2008 Aug 16.