

Tema 1.- Desarrollo biológico en síndrome de Down y otras discapacidades asociadas.

Ponencia: Descifrando el código genético en el síndrome de Down: cada vez más cerca de entender y predecir

Mara Dierssen Sotos. Fundación Privada Centro de Regulación Genómica de Barcelona. (España)

1. PATOLOGÍA HUMANA DEPENDIENTE DE DOSIS GÉNICA

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

La aneuploidía se relaciona con la alteración de los niveles de expresión génica de genes específicos, denominados por este motivo genes dosis-sensibles, pero su patogenia molecular precisa prácticamente no se conoce. La identificación de genes con un impacto fenotípico de cambio de dosis es

crucial para comprender no solamente estos síndromes sino variantes del número de copias presentes en la población general con posibles consecuencias patogénicas. Además, permitirá posiblemente identificar dianas moleculares con potencial terapéutico. El prototipo de enfermedad por exceso de material genético es la trisomía del par 21 o síndrome de Down (SD; OMIM 190685) y algunos síndromes de microdelección constituyen los modelos más frecuentes de monosomía.

1.1 Hipótesis de la dosis génica

Actualmente, dos hipótesis tratan de explicar los efectos causados por la presencia de un cromosoma 21 extra en los distintos fenotipos de SD. La primera de ellas, *“la hipótesis de la dosis génica”*, es considerada como la hipótesis central y consiste en explicar el fenotipo de SD como un incremento de dosis génica de un grupo de genes dosis sensibles, que codifican para determinadas proteínas especialmente durante el desarrollo (Ait Yahya-Graison, 2007; Delabar, 2006). La segunda, la de la *“ampliación de la inestabilidad del desarrollo”* aboga más bien por un efecto inespecífico mediado por un desequilibrio cromosómico en la homeostasis genética (Roizen, 2003; Shapiro, 1999).

Basándonos en 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,...) 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 de trisomía parcial de MMU16, el

Ts65Dn, se estimó que entre un 50 y un 60% de los genes contenidos en HSA21 o en la parte correspondiente del MMU16 eran genes dosis sensibles (Lyle, 2004).

1.2 Genes candidatos implicados en el síndrome de Down

Las estimaciones basadas en distintas bases de datos y publicaciones apuntan a que el HSA21 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 DSCR (*Down síndrome critical region*) cuya sola aparición en trisomía ya se considera suficiente para producir el fenotipo SD (Delabar, 1993; Korenberg, 1994; Rahmani, 1990). Sin embargo, la denominada 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 (Barlow, 2001; Korenberg, 1994). 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, 2007). Otra de las estrategias empleadas para buscar genes candidatos, enfocada principalmente en el 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, 2004; Kahlem,

2004; Lyle, 2004; Dauphinot, 2005; Sultan, 2007) como de muestras humanas (Bahn, 2002; Mao, 2003; Prandini, 2007). 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, 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, 2007; Sultan, 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 otros cromosomas que interaccionan de alguna manera con los primeros. Como resultado existirían determinadas combinaciones

alélicas que superarían ese umbral y por lo tanto darían lugar a la aparición de un determinado fenotipo, y otras combinaciones que, al no superar ese umbral, tendrían un efecto silencioso sobre el mismo fenotipo (Antonarakis, 2004).

Desde que a principios de siglo XXI apareció la secuencia completa del cromosoma HSA21 (Hattori et al., 2000), numerosos grupos han dedicado sus esfuerzos a estudiar la función de los genes contenidos en el cromosoma. Así, algunos genes candidatos que ayudan a explicar las alteraciones del SNC presentes en SD y que se han propuesto hasta hoy son: APP (Amyloid Precursor Protein), que codifica para el precursor beta-amiloide, involucrado en la formación de las placas seniles presentes en individuos con SD y enfermedad de Alzheimer. SOD1 (Superóxido dismutasa 1), 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. ETS2, protooncogén que codifica para un factor de transcripción, crucial en el proceso de la osteogénesis. SIM2 (single-minded 2), codifica para un factor de transcripción, su homólogo en *Drosophila* tiene una importante función como regulador de la neurogénesis. DSCR1 (Down syndrome critical region-1), codifica para una proteína inhibidora de la calcineurina, implicada en la vía de transducción mediada por NFATc. DYRK1A (Dual specificity Yak1- Related Kinase), codifica para una proteína serina/treonina quinasa. Entre sus sustratos se encuentran importantes factores de transcripción.

2. ALTERACIONES COGNITIVAS EN EL SÍNDROME DE DOWN

En nuestro grupo estamos interesados en la patogenia de la discapacidad intelectual y en cómo contribuye el desarrollo de las estructuras responsables de la discapacidad. El término discapacidad intelectual hace referencia a

limitaciones significativas no sólo en el funcionamiento intelectual sino también en la conducta adaptativa manifestada en las habilidades sociales y cotidianas que aparecen antes de los 18 años (AAMR, 2002). En las personas con SD, el coeficiente intelectual puede variar entre 40 y 80, pero lo más frecuente es que oscile alrededor de 50-60, siendo excepcionalmente superior a 70, por lo que se puede hablar de una discapacidad intelectual moderada (Anneren, 1996). El retraso mental (RM) asociado al SD se caracteriza por un retraso del desarrollo psicomotor, alteraciones de la memoria y del lenguaje y defectos cognitivos en el procesamiento auditivo-verbal, que con toda probabilidad dependen de las anomalías estructurales y funcionales presentes en el sistema nervioso central, pudiendo dar como resultado diversos tipos y grados de disfunción cognitiva y neurológica. Así, el RM en el SD se caracteriza por la dificultad de adquirir y estabilizar la información, como resultado de anormalidades neuronales concretas.

2.1 Disfunciones cognitivas en el síndrome de Down

Todos los individuos con SD presentan severos fenotipos neurológicos y conductuales, disfunción cognitiva y un bajo coeficiente intelectual (CI, entre 40 y 80). La infancia se caracteriza por un retraso en el desarrollo cognitivo que conduce a un RM moderado y a un descenso del CI desde el primer año de vida hasta la infancia tardía (Brown, 1990; Hodapp et al.). En los individuos adultos se produce un deterioro cognitivo debido presumiblemente a un envejecimiento acelerado (Devenny et al., 1996; Lott et al., 2005).

Los niños con SD presentan deficiencias en la producción del lenguaje y en el habla (Chapman, 1998); problemas de procesamiento de la información, deficiencias en la memoria a corto (captar y memorizar imágenes de objetos,

listados de palabras, números y frases) y a largo plazo (Carlesimo, 1997; Brown, 2003; Clark, 2003; Nadel 2003); problemas de consolidación de la memoria, alteraciones en los mecanismos de LTP y LTD (Kleschenikov et al 2004) y alteraciones del aprendizaje visuo-espacial (Uecker et al., 1993). 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). Estas disfunciones pueden deberse a factores intrínsecos (conexiones interneuronales) y a disfunciones en áreas del cerebro (hipocampo, corteza cerebral). La corteza prefrontal es necesaria para mantener la información, relacionarla y dotarla de contenido y de significado; las áreas de asociación corticales recogen y almacenan la información.

2.2 Alteraciones estructurales en cerebros con síndrome de Down

En individuos con SD entender mejor las causas de las disfunciones cognitivas podrían ayudar a la búsqueda de potenciales dianas terapéuticas, aunque actualmente las causas del RM y las disfunciones cognitivas son desconocidas, sabemos que ciertos cambios neuroanatómicos y funcionales descritos en personas con SD podrían estar involucrados:

A) una reducción en el tamaño de ciertas áreas cerebrales

A nivel macroscópico el cerebro de fetos con SD presenta un tamaño y peso reducidos (Jeringan, 1990); hipoplasia de los lóbulos frontal y parietal (Pinter et al 2001) y del hipocampo (Pinter et al 2001a); y reducción del número y profundidad de las cisuras (Raz, 1995;Jernigan), sugiriendo una reducción de la superficie cortical. Pueden apreciarse diferencias en los tiempos en que se van estableciendo las diferentes capas corticales de la neocorteza (Goldenet al., 1994) y se detectan áreas de microdisgenesia, que afectan a la organización histogenética de los mapas corticales.

B) alteraciones en neurogénesis

Estudios en fetos de diferentes semanas de gestación con DS muestran una reducción en el número de neuronas (Larsen et al 2008, Guidi et al 2008) y alteraciones en el patrón de laminación de la neocorteza y del hipocampo (Wisniewski, 1990). Debido a alteraciones en la neurogénesis en el hipocampo y un incremento de la apoptosis (Guidi et al 2008), producido por una reducción de las células proliferativas y alteraciones en el ciclo celular (Contestabile et al 2007).

C) una disminución del número de espinas dendríticas y de la dendritogénesis

En el período fetal no se aprecian diferencias en la morfología o en el número de espinas dendríticas. Sin embargo, a lo largo del primer año de vida se observa un marcado retraso en la aparición de espinas en las dendritas de las neuronas (Takashima et al., 1981), así como alteraciones en la morfología, el número y la densidad de las dendritas y las espinas dendríticas (Marin-padilla, 1972, 1976; purpura, 1974; becker, 1986; becker, 1991; takashima, 1989; takashima, 1994). Las espinas pueden ser anormalmente largas y sinuosas o, por el contrario, muy cortas (Fabregues y Ferrer, 1983; Marín Padilla, 1976; Purpura, 1974). A estas alteraciones se añade la disgenesia de las espinas dendríticas, caracterizada por una morfología anormal y una alteración de las propiedades de la membrana celular (Marin-Padilla, 1976; Suetsugu, 1980; Ferrer, 1990). Estas alteraciones se empiezan a detectar sobre todo en las etapas finales del período fetal, pero la arquitectura neuronal es prácticamente normal en el momento del nacimiento.

D) alteraciones en sinaptogénesis y conectividad neuronal

Mediante microscopía electrónica se aprecian claras alteraciones en el aparato sináptico (Scott et al., 1983). La densidad sináptica (número de sinapsis por unidad de volumen) se encuentra algo reducida en ciertas áreas cerebrales, y la morfología de las sinapsis muestra ciertas alteraciones como

son una disminución de la longitud pre y postsináptica, así como del área de contacto sináptico (Wisniewski et al., 1986). A su vez, existen alteraciones de los niveles de los neurotransmisores y proteínas específicas relacionadas con estos procesos (Wisniewski et al., 1991; risser, 1997; schneider, 1997; nadel, 2003; Shim et al., 2002).

Así, el cerebro fetal de SD se caracteriza por una reducción del grosor y una laminación alterada de la neocorteza y del hipocampo, y disminuciones de los índices proliferativos con consecuencias en la celularidad y la densidad sináptica. Estas regiones tienen la función de almacenar, recapitular, e integrar la información para organizar funciones complejas como la memoria, la abstracción, la deducción, ó el cálculo. Así, la trisomía podría afectar de manera concreta a los cambios estructurales y funcionales de los procesos de memoria y aprendizaje, mediante el desequilibrio de dosis génica de determinados genes candidatos.

3. MODELOS MURINOS DE SÍNDROME DE DOWN

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. La identificación en los últimos años de genes dosis sensibles, en los que pequeños cambios en los niveles de expresión pueden tener consecuencias fenotípicas importantes abre nuevas vías no solamente para comprender la patogenia de la enfermedad, sino también para la identificación de dianas moleculares que puedan tener un papel protector o revertir las alteraciones presentes en los pacientes con SD. A pesar de las diferencias filogenéticas que existen entre ratones y seres humanos, el genoma de ambos guarda una alta homología (Mural, 2002), comparte un 99% de sus genes con el ser humano. En el ratón los genes ortólogos a los del

cromosoma 21 humano se localizan en los cromosomas murinos 16 (MMU16) en un 80% mientras que el 20% restante era sinténico con los cromosomas MMU10 y MMU17 (Dierssen et al., 2001). El MMU16 contiene a su vez genes ortólogos de otros cromosomas humanos (cromosoma 3, 22, 8 y 16). Debido a la elevada sintenia entre el HSA21 y MMU16, se han generado diversos modelos de ratones trisómicos para el MMU16 como modelos del SD.

La mayor parte de los desbalances de dosis cromosómicas no son viables, pero en el caso del cromosoma 21 la viabilidad posiblemente reside en la poca densidad de regiones codificantes de este cromosoma, el menor del genoma humano. En efecto, el cromosoma 21 (HSA21) es el autosoma humano más pequeño, representando el 1-1.5% de la longitud total del genoma haploide. Siguiendo la hipótesis del SD de la dosis génica basada en que el fenotipo observado es consecuencia de la sobreexpresión de genes específicos, la generación de modelos murinos genéticamente modificados para estudiar la relación genotipo/fenotipo de los genes del HSA21 (Dierssen, 2001) es una técnica de fundamental importancia para conseguir la identificación de genes con relevancia patogenética y el esclarecimiento de las bases moleculares, bioquímicas y celulares del SD. Las estrategias utilizadas para la generación de modelos de SD en el ratón han sido tres:

1. La generación de ratones con una copia extra, ya sea completa o parcial, del cromosoma MMU16 que comparte regiones de sintenia conservada con el HSA21. Estos modelos constituyen un modelo global de la enfermedad *in vivo*.
2. La introducción de fragmentos grandes de DNA (YACs o BACs) en el genoma del ratón.

3. La sobreexpresión de un único gen, o combinación de genes, de este cromosoma que permitirá diseccionar la participación de genes individuales en el fenotipo y realizar experimentos de terapia génica.

El análisis comparativo de los fenotipos observados entre los diferentes modelos permite una aproximación a los genes que pueden tener un papel más relevante en esta patología, con las limitaciones propias de estas metodologías (diferentes fondos genéticos, promotores heterólogos, modelos inducibles etc).

3.1. Modelos trisómicos (MMU16)

El ratón **Ts16** presenta una trisomía del MMU16 (Gropp, 1975) generado por una translocación robertsoniana espontánea, contiene la región ortóloga de la mayor parte del HSA21 y presenta los fenotipos observados en pacientes con SD. La principal limitación de este modelo es su letalidad embrionaria (mueren hacia el día embrionario 15). Los fetos trisómicos presentan alteraciones cardíacas, anomalías craneofaciales y una importante afectación a nivel del SNC caracterizado por hipoplasia cerebral, retraso en la córtico-génesis, déficit en la neurogénesis, degeneración de neuronas colinérgicas hipocámpales y alteraciones de la conectividad neuronal (Haydar et al. 1996; Sweeney et al., 1989; Dorsey et al 2002).

El ratón **Ts65Dn** es uno de los modelos trisómicos más estudiados, presenta triplicación de la región comprendida entre el gen *App* y *Znf295* (región sinténica al HSA21 y contiene la DSCR), fue generado tras una translocación no robertsoniana recíproca entre los cromosomas MMU16 y MMU17 (Davisson, 1990; 1993).

Este ratón es viable, aunque un gran número de estos ratones mueren durante el periodo perinatal (Roper, et al. 2006); presenta muchos de los signos patológicos de SD entre los que destacan la infertilidad exclusiva de los machos, la aparición de rasgos dismórficos (Richtsmeier et al., 2000), las alteraciones craneofaciales (Richtsmeier, 2002) y neurales. Las disfunciones cognitivas en memoria espacial (Escorihuela, 1995; Demas, 1996; Reeves, 1995), memoria de trabajo y de referencia (Holtzman et al., 1996; Escorihuela et al., 1998; Sago et al., 2000; Hunter, 2003), memoria reciente (Coussons-Read, 1996; Holtzman, 1996) y discriminación de contexto (Hyde, 2001); estos déficits en memoria y aprendizaje, sugieren una disfunción a nivel de hipocampo y corteza cerebral. En el hipocampo se han hallado numerosas alteraciones como defectos a nivel sináptico relativos al sistema β -adrenérgico (Dierssen, 1997), cambios en la expresión del receptor p75 (Cooper, 2001), alteraciones morfológicas en las espinas del giro dentado y CA1 (Belichenko, 2004), reducción en LTP y aumento de LTD (Siarey et al., 1997; Siarey et al., 1999; Kleschevnikov et al., 2004; Costa, 2005), reducción de la densidad neuronal en el giro dentado debida a déficits en proliferación celular (Insausti et al., 1998; Rueda et al., 2005), y reducción de la densidad neuronal en CA1 y sináptica en CA1 y CA3 (Kurt et al., 2004). En la corteza cerebral muestran una reducción en las sinapsis excitatorias de la corteza temporal (Kurt, 2000) y una menor complejidad del árbol dendrítico de las neuronas piramidales de la corteza frontal (Dierssen 2003), que comprometería el correcto funcionamiento de la circuitería cerebral con importantes implicaciones conductuales. Este modelo también presenta alteraciones motoras relevantes caracterizadas por hiperactividad (Coussons-Read, 1996; Escorihuela, 1995), disfunción en la coordinación motora (Costa, 1999), en el patrón de la marcha (Hampton, 2004) y el equilibrio. Algunas de estas alteraciones podrían estar relacionadas con la disfunción

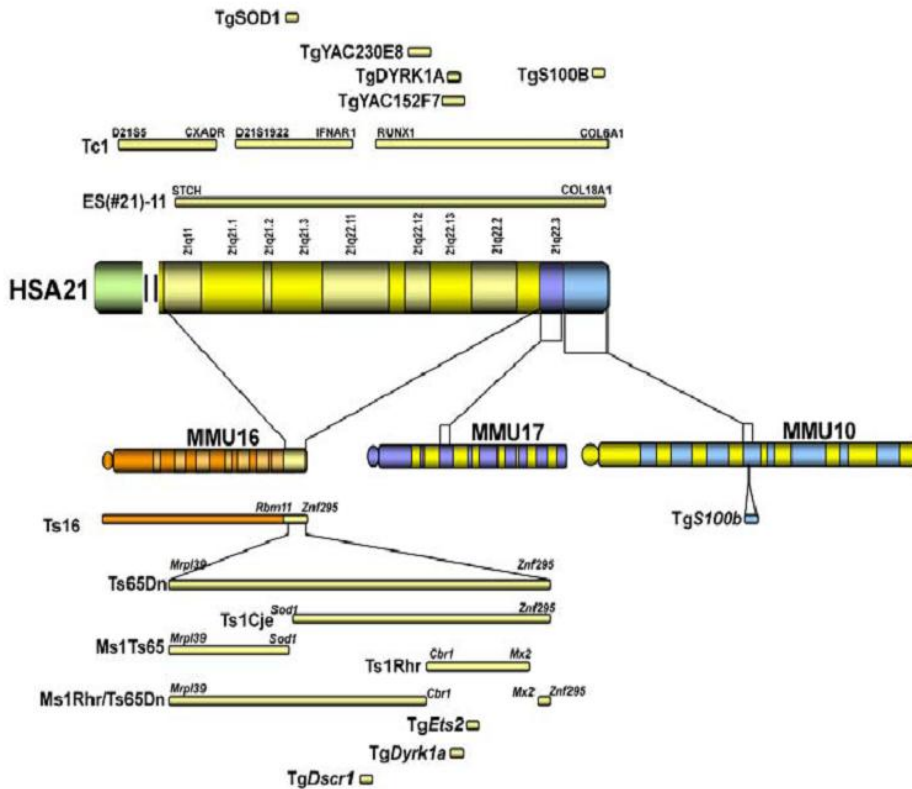
cerebelar debida a una reducción en el volumen cerebelar acompañado de una disminución en la densidad de las células granulares (Baxter, 2000; Olson et al., 2004), cuya causa parece ser una reducción del proceso mitogénico sobre los precursores neuronales (Roper et al., 2006). Además, el ratón Ts65Dn muestra varios de los rasgos característicos de la enfermedad de Alzheimer (EA) como son la degeneración colinérgica del prosencéfalo basal asociada a la edad (Holtzman, 1996; Granholm, 2000) acompañada de un incremento compensatorio de la actividad colinoacetil transferasa en el hipocampo (Seo, 2005), y de un fallo en el transporte retrógrado de NGF (Cooper, 2001).

El ratón **Ts1Cje** posee un segmento cromosómico extra más corto que el ratón Ts65Dn, extendiéndose desde el gen *Sod1* hasta *Znf295*, pero *Sod1* no es funcional (Sago, 1998). Este modelo, muestra una reducción de volumen cerebelar y de células granulares (Olson et al., 2004) y una reducción de LTP en CA1 (Siarey et al., 2005) y en DG (Belichenko et al. 2007), similares al ratón Ts65Dn pero menos severas. 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).

El ratón **Ms1Ts65** cuyo segmento extra abarca la región comprendida entre *Sod1* y *App* y que se obtuvo a partir de los cruces entre Ts65Dn y Ts1Cje permite determinar la contribución de la región sobreexpresada en Ts65Dn pero no presente en el ratón Ts1Cje. Este modelo presenta 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).

El ratón **Ts1Rhr** triplica sólo el 32% de los genes del ratón TS65Dn y contiene únicamente el segmento ortólogo a DSCR. Este ratón no presenta las alteraciones craneofaciales observadas en el resto de los modelos trisómicos (Olson, 2004). Recientemente se ha descrito la presencia de alteraciones del volumen cerebelar al igual que en los otros modelos trisómicos (Aldridge et al., 2007).

El modelo trisómico generado más recientemente es el ratón **Tc1**, presenta una trisomía casi total, el 92% del cromosoma 21 humano. Originado mediante generación de líneas transcromosómicas de células madre embrionarias que contienen un cromosoma HSA21. Estos ratones presentan alteraciones en la plasticidad sináptica, en el número de neuronas cerebelares, en el desarrollo del corazón, en el tamaño mandibular y un déficit en la tarea de reconocer un objeto nuevo (O'Doherty et al., 2005). Recientemente, se ha descrito que los Tc1 tienen alterada la memoria espacial de trabajo y la memoria a corto plazo, así como la LTP a una 1 h (Morice et al. 2008).

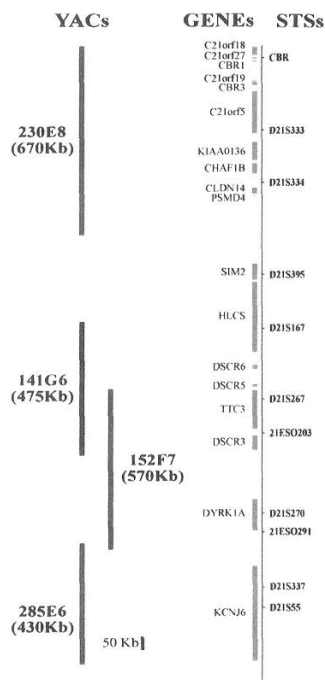


Esquema 1. Representación de los genes presentes en cromosoma HSA21 ortólogos en los cromosomas murinos (MMU 16,17, 10) y de los modelos murinos trisómicos y transgénicos. (Obtenido de Delabar et al., 2006)

3.2. Modelos transgénicos de YACs, BACs y PACs

Estos modelos se generaron a partir de la triplicación de regiones cromosómicas más cortas permitiendo limitar y acotar el número de genes candidatos en trisomía. A partir de “librerías in vivo” de una región de 2Mb incluida en la DSCR, se crearon cromosomas artificiales de levaduras (YAC, Yeast Artificial Chromosome), de bacteria (BAC, Bacterial Artificial Chromosome) y del bacteriófago P1 (PAC, P1 Bacteriophage Artificial Chromosome) que presentaban en triplicado diferentes fragmentos

genómicos contiguos o parcialmente solapados con los otros (Smith, 1995; Smith, 1997). El estudio comparativo de los modelos mostró que únicamente el ratón **YAC152F7** (5 genes) presentaba alteraciones en aprendizaje y memoria e hiperactividad durante el desarrollo, además de un incremento en el volumen cerebral y en el tamaño neuronal (Branchi, 2004; Rachidi and Lopes, 2007), si bien se observaban variaciones fenotípicas en celularidad en el **YAC230E8** (9 genes). Por otra parte, la sobreexpresión de **DYRK1A** en el **YAC152F7** se asocia con un incremento en la fosforilación de una proteína de ciclo celular, ciclina B1 (Branchi, 2004). Además de estos modelos, utilizando un cromosoma de bacteria (BAC, Bacterial Artificial Chromosome) que incorpora únicamente el gen **DYRK1A** humano completo con su promotor homólogo, se generó un ratón transgénico que sobreexpresaba **DYRK1A**, simulando así la dosis de este gen presente en SD. Estos ratones presentan alteraciones en plasticidad sináptica asociadas a modificaciones en LTP y LTD (Ahn, 2006).



Esquema 2. Representación de la DSCR destallando los 4 YACs empleados para la generación de los modelos murinos transgénicos. Obtenido de Branchi et al, 2004.

3.3. Modelos transgénicos de gen único

La generación de modelos murinos genéticamente modificados con la sobreexpresión de genes específicos permite identificar si pequeños incrementos de dosis génica producen un fenotipo. Estos modelos presentan copias extras de genes candidatos 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. Se ha estudiado un modelo murino con sobreexpresión de *Dyrk1A* (TgDyrk1A) que sobreexpresa el cDNA de *Dyrk1A* de rata, bajo el control del promotor heterólogo de la metalotioneína de oveja (pSMT-Ia). Se establecieron distintas líneas de ratones transgénicos observándose una expresión generalizada del transgén en todos aquellos tejidos estudiados (corazón, cerebro, hígado...) (Altafaj et al., 2001). El análisis de las alteraciones conductuales presentes en el modelo TgDyrk1A (Altafaj et al., 2001; Martínez de Lagran et al., 2004) reveló: A) alteraciones en el neurodesarrollo: un retraso de la adquisición de una actividad locomotora madura; B) alteraciones en la coordinación motora durante el neurodesarrollo y en etapas adultas; C) hiperactividad; D) alteraciones del aprendizaje motor y de la organización locomotora; y E) alteraciones de los procesos de memoria y el aprendizaje, especialmente de la memoria de referencia y del aprendizaje visuo-espacial. Este conjunto de alteraciones en el fenotipo motor y cognitivo en el ratón TgDyrk1A, puede relacionarse con una disfunción en diferentes áreas cerebrales dónde el gen se sobreexpresa: cerebelo, núcleo estriado, corteza motora, corteza prefrontal e hipocampo.

3.4. Alteraciones cognitivas en modelos murinos de síndrome de Down

El empleo de modelos murinos genéticamente modificados ha demostrado ser una herramienta muy útil para esclarecer la influencia de la sobreexpresión

de un gen o un conjunto de genes a un determinado fenotipo. A pesar de las diferencias filogenéticas que existen entre ratones y seres humanos, el genoma de ambos guarda una alta homología (Mural, 2002). Dadas las dificultades metodológicas por explorar el cerebro de personas con SD en fases del desarrollo embrionario o postnatal temprano, el uso de modelos murinos es una herramienta muy útil para investigar las características neuroanatómicas y funcionales en estos estadios.

Ratones trisómicos **Ts16** (trisomía del MMU16, Gropp, 1975) presentan hipoplasia cerebral, retraso en la corticogénesis, déficit en la neurogénesis, alteraciones en la migración radial y tangencial y alteraciones de la conectividad neuronal (Haydar et al. 1996, 2000; Sweeney et al., 1989; Dorsey et al 2002). El ratón **Ts65Dn** (Davisson, 1990) en estadios embrionarios presenta un importante retraso en la formación de la neocorteza y el hipocampo, debido al incremento de la duración del ciclo celular y la reducción de la neurogénesis en la zona subventricular (SZ) de los ratones trisómicos; así como una hipocelularidad mantenida hasta el nacimiento (Chakrabarti et al 2008). En estadios postnatales tempranos muestran una reducción de las neuronas granulares (Lorenzi et al. 2006) y de las neuronas proliferantes en el DG (Contestabile et al., 2007); y déficits en sinaptogénesis (Chakrabarti et al 2008). En la etapa adulta las disfunciones cognitivas observadas son alteraciones en memoria espacial (Escorihuela, 1995; Demas, 1996; Reeves, 1995), memoria de trabajo (Hunter, 2003), memoria reciente (Coussons-Read, 1996; Holtzman, 1996), discriminación de contexto (Hyde, 2001) y disrupciones en LTP y LTD (Siarey, 1997; Costa, 2005). Los otros modelos murinos no han sido estudiados en etapas embrionarias, aunque muestran alteraciones en el fenotipo cognitivo adulto: los ratones **Ts1Cje** (Sago, 1998) muestra alteraciones en aprendizaje y memoria; el modelo **Tc1**

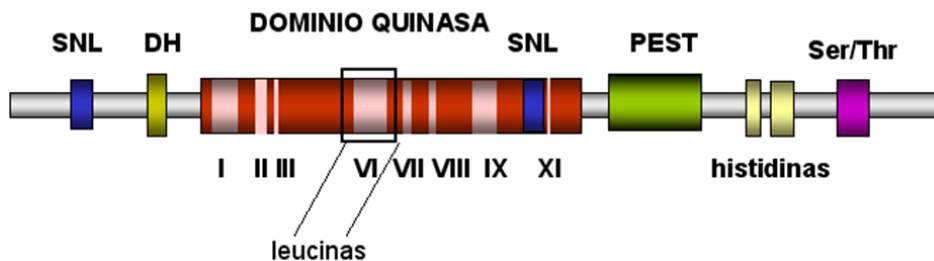
(trisomía del HSA21, O'Doherty et al., 2005) presenta alteraciones en la plasticidad sináptica, de la memoria espacial de trabajo y la memoria a corto plazo, así como la LTP (Morice et al. 2008); y finalmente, los ratones transgénicos generados mediante cromosomas artificiales de levaduras (YACs), **YAC152F7** (contienen el gen *Dyrk1A* triplicado, Branchi, 2004) y mediante cromosomas de bacterias (BACs), **DYRK1ABAC** (sobrexpresan *DYRK1A*, Ahn, 2006) presentan alteraciones en aprendizaje y memoria.

4. GENES CANDIDATOS PARA SINDROME DE DOWN: EL GEN *DYRK1A*

En los últimos años, numerosas evidencias experimentales han permitido proponer que el gen *DYRK1A* podría jugar un papel importante en el SD, tanto durante los periodos embrionarios como en la vida adulta actuando sobre diferentes aspectos estructurales y funcionales del SNC. *DYRK1A* participa en el neurodesarrollo, por lo que los efectos de su desregulación en el adulto pueden ser consecuencia de alteraciones del neurodesarrollo no compensadas. Los argumentos que han implicado el gen *DYRK1A* en SD y le convierten en un gen candidato son: la localización en la DSCR, su localización subcelular puede variar con posibles consecuencias funcionales, de expresa en tejidos fetales y adultos (Guimera, 1996; 1999; Shindoh, 1996; Song, 1996) y se sobrexpresas en el cerebro de personas con SD (Guimera, 1999).

DYRK1A (Dual specificity Yak1- Related Kinase) es un gen de copia única que se localiza entre las regiones 21q22.13 y 21q22.2 del HSA21 enmarcado dentro de la DSCR (Hattori, 2000). Clonado en 1996 por diversos grupos de investigación (Guimera, 1996; Shindoh, 1996; Song, 1996), *DYRK1A* se

extiende a lo largo de 150 kb y está constituido por al menos 14 exones, 11 de los cuales son codificantes (Wang, 1998; Guimera, 1999). Codifica para una serina/treonina quinasa de actividad dual que codifica para una proteína de 763 aminoácidos, con una masa molecular estimada de unos 90 kDa (Kentrup, 1996), que fosforila sustratos exógenos en residuos serina/treonina y se autofosforila en residuos tirosina (Becker, 1999; Kentrup, 1996; Wiechmann, 2003; Lochhead, 2005). El dominio catalítico está constituido por 11 subdominios (I-XI) que incluyen: 1) un motivo de cuatro leucinas que podría formar una estructura de cremallera de leucinas, generalmente implicada en interacciones proteína-proteína o proteína-DNA; 2) un dominio PEST rico en serinas y treoninas, en la región carboxi-terminal del dominio catalítico, posiblemente implicado en la degradación de las proteínas (Rechsteiner and Rogers, 1996); y 3) dos señales de localización nuclear (SLN), una en el extremo amino terminal (Becker, 1998 #125) y otra entre los dominios catalíticos X-XI (Álvarez, 2003) rica en histidinas responsables de su localización subcelular a nivel nuclear.



Esquema 4. Representación esquemática de la estructura proteica de la proteína DYRK1A.

Se han descrito seis miembros más de la familia con características estructurales conservadas (Dyrk1B, Dyrk1C, Dyrk2, Dyrk3, Dyrk4A y Dyrk4B). DYRK1A y otros miembros de la familia Dyrk son únicos entre las

serina/treonina quinasas por el hecho de que su activación depende de la autofosforilación en residuos tirosina. También a nivel de mRNA los niveles de DYRK1A están sometidos a una estrecha regulación. Estos datos sugieren que el mantenimiento de los niveles de esta proteína dentro de unos límites determinados es crucial para la célula, y en definitiva nos indica que se trata de una proteína muy sensible a la dosis génica y, por tanto, susceptible de provocar cambios de fenotipo en casos en que exista una desregulación sutil de sus niveles, como ocurre en el SD. Se ha sugerido que la proteína Dyrk1A está implicada en la regulación del ciclo celular. En la levadura, la quinasa Yak1 se caracteriza por ser un regulador negativo del crecimiento celular (van Es et al., 2001). En *Drosophila* el gen análogo *minibrain* (*mnb*) se identificó por su implicación en la neurogénesis postembrionaria para la proliferación de los neuroblastos (Tejedor, 1995).

4.1. Localización subcelular de Dyrk1A

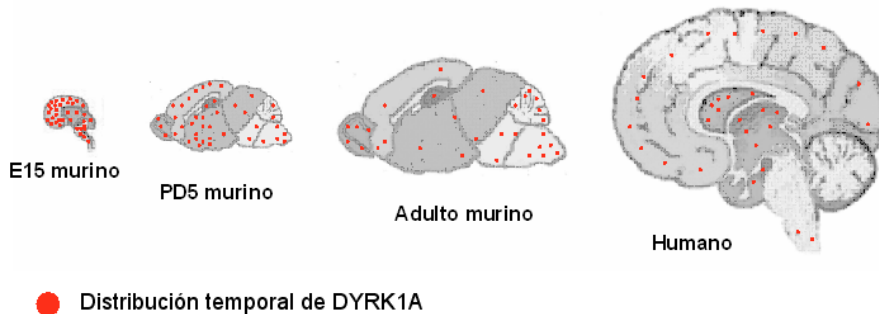
Se ha descrito la localización de DYRK1A tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células. Inicialmente en estudios de transfección, se detectó la presencia de la proteína mayoritariamente en el núcleo, formando unas estructuras llamadas “speckles” (agrupaciones de proteínas nucleares que forman un patrón punteado irregular) (Becker et al., 1998; Alvarez et al. 2003), dependiente de la secuencia localizada en el c-terminal del dominio quinasa que tiene 13 residuos de histidinas consecutivas. Confirmando la hipótesis del direccionamiento de la proteína al núcleo mediada por las señales de localización nuclear. En neuronas se ha propuesto una localización doble en el núcleo y en el citoplasma. Se ha descrito una distribución citoplasmática en neuronas y en las dendritas proximales, así como en las sinapsis (Hammerle 2002, Marti 2003, Wegiel 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, especialmente regulando la actividad de diferentes factores de transcripción a través de su fosforilación.

4.2. Patrón de expresión de Dyrk1A en el SNC

El estudio de expresión de la proteína revela una elevada expresión durante los estadios embrionarios que disminuye gradualmente en etapas postnatales (Okui, 1999), indicando una regulación diferencial entre la transcripción del RNAm y el recambio proteico. En estadios embrionarios, Dyrk1A se expresa de forma ubicua, aunque con mayor intensidad en retina, bulbo olfatorio y médula espinal. Recientemente, estudios de expresión en ratón han descrito la expresión de la proteína en cuatro fases secuenciales: expresión transitoria en progenitores preneurogénicos, expresión en progenitores neurogénicos dependientes de ciclo celular, expresión transitoria en neuronas recién nacidas y expresión persistente en neuronas diferenciadas (Hammerle et al. 2008). En el gen *DYRK1A* humano, presenta niveles elevados de expresión en cerebro de personas con SD (Guimerá et al., 1996). En el cerebro humano adulto, *DYRK1A* se expresa en regiones afectadas en SD como las capas superficiales de la neocorteza, en hipocampo principalmente en CA1, en núcleo caudado y tálamo. Aunque, el patrón de expresión en cerebro humano es ligeramente diferente al detectado en cerebro de ratón adulto y no sólo varía entre las diversas regiones del cerebro sino también entre diferentes tipos neuronales dentro de una misma estructura cerebral. A modo de ejemplo, en el cerebelo humano no se observa marcaje frente a esta proteína (Wegiel, 2004), mientras que en ratón existe una expresión intensa en la corteza cerebelosa (Marti, 2003). En el cerebro adulto aparece en corteza

cerebral, cerebelo, en neuronas piramidales del hipocampo y diversos núcleos hipotalámicos (Song, 1996; Guimera, 1996; Rahmani, 1998) estructuras severamente afectadas en SD. De manera similar, la expresión proteica de Dyrk1A en ratón se localiza principalmente en bulbo olfatorio, cerebelo, núcleos motores profundos, cerebelo y médula espinal (Marti et al. 2003).



Esquema 5. Expresión espacio-temporal de Dyrk1A en cerebro.

Obtenido de Dierssen & Martínez de Lagrán, 2006.

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

4.3. Papel de Dyrk1A en el neurodesarrollo

El patrón de expresión en el SNC sugiere que, durante el neurodesarrollo, el gen Dyrk1A puede ejercer un efecto sobre el control de eventos de proliferación y maduración neuronal, mientras que en el adulto puede estar más circunscrito a funciones específicas. La pérdida de dosis génica de Dyrk1A en la *Drosophila* mutante para *mnb* (Tejedor, 1995) y en el modelo murino con haploinsuficiencia de Dyrk1A (*Dyrk1A*^{+/-}) (Fotaki, 2002) genera una reducción del tamaño cerebral, con mayor afectación de ciertas áreas. De

igual forma, en modelos murinos con sobreexpresión de *Dyrk1A* se han detectado cambios de tamaño cerebral si bien éstos son dispares. *Dyrk1A* se expresa transitoriamente en progenitores preneurogénicos y en neuronas recién nacidas durante la transición desde las divisiones proliferantes hacia las neurogénicas y permanentemente en neuronas diferenciadas (Hammerle, 2002; 2008). También, existe una onda de expresión de la proteína *Dyrk1A* durante la embriogénesis tardía, concretamente en poblaciones neuronales que inician la diferenciación (Hammerle, 2003) y justo en ese momento se produce un incremento de la expresión a nivel nuclear. Estos efectos sobre proliferación podrían estar directamente relacionados con la reducción del tamaño del cerebro de pacientes con SD que se ha sugerido que podría ser consecuencia de una hipocelularidad (Becker, 1991; Coyle, 1986). También se ha involucrado a *DYRK1A* en las señales de transducción dependientes de Ras necesarias para la promoción y mantenimiento de la diferenciación neuronal (Kelly, 2005).

4.4. Papel de *DYRK1A* en los procesos cognitivos

El patrón de expresión en el SNC sugiere que el gen *Dyrk1A* en el adulto puede estar más circunscrito a funciones específicas, como son los procesos de aprendizaje/memoria y la función motora. Los cambios acontecidos durante el desarrollo determinarán el funcionamiento del SNC durante la etapa adulta, y por tanto los efectos de la desregulación de *Dyrk1A* durante etapas embrionarias y fetales condicionarán la eficiencia de los sistemas neurales a largo plazo. Sin embargo, también se observa expresión de *DYRK1A* en el adulto en regiones cerebrales implicadas en funciones cognitivas por lo que no se puede descartar la implicación de esta proteína en aspectos funcionales específicos en el adulto y no solamente derivados de las alteraciones del neurodesarrollo. El estudio comparativo de expresión de

DYRK1A en humanos utilizando tejidos procedentes de niños y adultos, indicó que la maduración del cerebro humano aparece asociado a un incremento en el número de neuronas DYRK1A positivas y a la acumulación de esta proteína en el soma neuronal, dendritas y sinapsis (Wegiel, 2004). Añadiendo a su localización en la sinapsis el hecho de que Dyrk1A fosforila dinamina (Chen-Hwang, 2002), no se puede descartar su posible papel en el ensamblaje del aparato endocítico, implicando esta proteína en la regulación de la transmisión sináptica y los cambios en su eficacia subyacentes a los procesos de memoria y aprendizaje. Asimismo, Dyrk1A es capaz de fosforilar factores de transcripción asociados a procesos cognitivos como CREB (Yang, 2001) o NFAT (Arron, 2006). Finalmente, el hecho de que los diversos modelos murinos con cambio de dosis de Dyrk1A presenten alteraciones cognitivas relevantes y que en humanos, DYRK1A se sobreexpresa en algunas estructuras afectadas en SD asociadas al retraso mental, como la corteza cerebral y el hipocampo, refuerzan la hipótesis de la participación de Dyrk1A en la regulación de los procesos cognitivos.

4.5. Papel de DYRK1A en la función motora

La expresión en ratón de Dyrk1A en áreas relacionadas con el control motor como el cerebelo, la médula espinal y núcleos motores relacionados (Marti, 2003) apuntan a una posible implicación del gen en estas funciones. Los modelos murinos con sobreexpresión de Dyrk1A (Ts65Dn, YAC152F7, TgDyrk1A) muestran hiperactividad, alteraciones motoras moderadas y retraso en el desarrollo neuromotor (Altafaj, 2001; Costa, 1999; Hyde, 2001; Branchi, 2004), mientras que el modelo murino con haploinsuficiencia de Dyrk1A muestra hipoactividad (Fotaki, 2002) y en la *Drosophila* mutante con reducción de dosis de *mb* se han detectado alteraciones en actividad locomotora (Tejedor, 1995). Estas observaciones involucran a DYRK1A en

la adquisición de las habilidades motoras pero posiblemente también en la propia funcionalidad de los sistemas motores en el adulto. Por tanto no se puede descartar que su sobreexpresión en SD pueda tener consecuencias en la disfunción motora presente en estos pacientes. En definitiva, el gen Dyrk1A a través de la proteína que codifica parece desempeñar una función relevante durante el desarrollo neuronal, tanto en procesos de proliferación como de diferenciación, con consecuencias sobre procesos cognitivos y motores.