

Bases moleculares de las neuropatologías del síndrome de Down: implicación del gen *Minibrain*

Molecular basis of Down syndrome's neuropathologies: implication of the Minibrain gene

Unidad de Neurobiología del Desarrollo
Instituto de Neurociencias, CSIC
Universidad Miguel Hernández
San Juan (Alicante)

Hämmerle B.
Colonques J.
Vera E.
Chulia J.
Tejedor F. J.

RESUMEN

El síndrome de Down (SD) genera un amplio número de anomalías, de las cuales las más graves son las neuropatologías que hacen del SD la causa más frecuente de retraso mental. El SD se debe a la triplicación del cromosoma 21. En base a estudios genéticos y a la secuenciación de este cromosoma se han podido identificar los genes posiblemente más relevantes para la generación del SD, entre los cuales destaca *Minibrain (Mnb)*.

El objetivo de este trabajo ha sido generar modelos experimentales *in vivo* para estudiar si las bases moleculares de las neuropatologías asociadas con el SD podían resistir en la alteración del gen *Mnb*. Con este fin, y para poder utilizar embriones de pollo como modelo experimental, se clonó el ortólogo de *Mnb* en pollo. Estudios de expresión de *Mnb* junto con experimentos de sobreexpresión llevados a cabo en transgénicos, sugieren que este gen está implicado en diversas funciones como proliferación y diferenciación a lo largo del desarrollo del cerebro.

Palabras clave: Síndrome de Down, cerebro, desarrollo, neuropatologías, proliferación, diferenciación.

Hämmerle B, Colonques J, Vera E, Chulia J, Tejedor F J
Bases moleculares de las neuropatologías del síndrome de Down: implicación del gen *Minibrain*
Mapfre Medicina, 2003; 14: 210-216

Correspondencia:

Francisco J. Tejedor
Unidad de Neurobiología del Desarrollo
Instituto de Neurociencias
CSIC y Universidad Miguel Hernández
03550 San Juan (Alicante)

ABSTRACT

Down's syndrome (DS) generates a large number of abnormalities. Neuropathologies are among the most severe abnormalities and make DS the most frequent cause of mental retardation. DS is originated by a triplication of chromosome 21. Based on genetic studies and the sequencing of chromosome 21, genes, which localize at the DS critical region have been identified. Among these genes, *Minibrain (Mnb)* appears as the most likely candidate to explain some DS neuropathologies.

The goal of this work has been to generate *in vivo* experimental models to study the molecular basis of the possible involvement of *Mnb* on DS neuropathologies. In order to use chick embryos as an experimental model, the chick orthologue of *Mnb* has been cloned. Studies of *Mnb* expression together with overexpression experiments carried out on transgenics, suggest that this gene is involved in different functions like proliferation and differentiation along brain development.

Key words: Down's syndrome, brain, development, neuropathologies, proliferation, differentiation.

Hämmerle B, Colonques J, Vera E, Chulia J, Tejedor F J
Molecular basis of Down syndrome's neuropathologies: implication of the *Minibrain* gene
Mapfre Medicina, 2003; 14: 210-216

Fecha de recepción: 21 de enero de 2002

Trabajo financiado con una Ayuda a la Investigación de la Fundación MAPFRE Medicina

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Down (SD) es la causa más frecuente de defectos de nacimiento en la población humana (1). Tiene lugar en aproximadamente uno de cada 700 nacimientos. Son muy diversas las anomalías y patofisiologías que genera: estatura corta, anomalías craneofaciales, defectos en el esqueleto, braquicefalia, microcefalia, envejecimiento prematuro, cataratas congénitas, defectos endocardiales, etc. No obstante, hemos de resaltar aquí que son las alteraciones neuropatológicas las que hacen del SD la causa principal de retraso mental. Entre las neuropatologías caben destacar dos: la disminución en el número de neuronas en zonas definidas del cerebro y la aparición de síntomas neurodegenerativos parecidos a la enfermedad de Alzheimer (2). En la mayoría de los casos, el SD se debe a la triplicación completa del cromosoma 21, que aparece primariamente por una no-disyunción materna, pero en numerosas ocasiones se produce en personas portadoras de traslocaciones no balanceadas que resultan en la triplicación de solo parte del cromosoma 21. En base a la correlación fenotipo-genotipo en estas trisomías parciales se ha definido una región denominada *Down syndrome critical region* (DSCR) (2-4). Así, las consecuencias fenotípicas del SD son probablemente resultado de la sobreexpresión y de las interacciones subsiguientes de varios genes del cromosoma 21. Desde este punto de vista, los genes localizados en la DSCR con una presunta función en el cerebro son potenciales candidatos para explicar las neuropatologías del SD. La reciente secuenciación del cromosoma 21 (5) ha permitido la identificación de los genes comprendidos dentro de la DSCR. De entre el reducido número de estos genes que han sido relacionados con función en cerebro: *Mnb*, *SIM2* y *DSCAM* (6-8), *Mnb* destaca como el mejor candidato a explicar las neuropatologías del SD por su implicación en neurogénesis y memoria/aprendizaje (9, 10).

Nuestro grupo en colaboración con otros investigadores ha clonado y caracterizado el gen *Minibrain* (*Mnb*) de *Drosophila* (9). Los mutantes *Mnb* se caracterizan por una amplia reducción del tamaño de determinadas zonas del cerebro, por presentar cierto grado de degeneración en el desarrollo tardío y por exhibir claros defectos en memoria y aprendizaje (9, 11). La reducción del tamaño del cerebro es debida a la disminución del número de neuronas que acontece durante los procesos proliferativos del desarrollo postembrionario (12). Así *Mnb* está claramente implica-

do en los procesos de neurogénesis del SNC. El gen consta de una unidad de transcripción que produce por *splicing* alternativo una nueva familia de protein-quinasas. Las mutaciones caracterizadas causan una desregulación de la expresión de *Mnb*-quinasas con alteración en los niveles de los diversos transcritos (9). Por varios caminos se han clonado posteriormente los genes homólogos de *Mnb*: *Dyrk1A* en rata (13) y *MNB* en humanos (14, 15) que presentan una alta homología con el de *Drosophila*. En este sentido, nosotros hemos demostrado recientemente que los transcritos de *Drosophila* y vertebrados comparten una alta homología estructural, una característica actividad fosforilante dual serina/treonina y tirosina y una capacidad de translocarse al núcleo celular, lo que sin duda lo agrupa en una familia génica bien conservada evolutivamente (16).

En la literatura reciente del tema se ha usado frecuentemente el argumento de que las personas con SD presentan un cerebro de menor tamaño (con disminución del número de neuronas en regiones cerebrales definidas: cerebelo, el hipocampo y algunas capas de la corteza cerebral) como, en cierto modo reminiscente del fenotipo de los mutantes *Mnb* de *Drosophila* y, por tanto, hacen extensiva a vertebrados la función en neurogénesis demostrada para el gen de *Drosophila*. Paradójicamente, todos los estudios publicados hasta la fecha sobre expresión de *Mnb/Dyrk* en vertebrados no presentan evidencias experimentales de un posible papel en neurogénesis (13-15, 17, 18). A fin de establecer relaciones funcionales a nivel celular hemos abordado en estos dos últimos años el estudio de la implicación de *Mnb* en el control del número de neuronas durante el desarrollo embrionario del cerebro de *Drosophila* y de vertebrados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de laboratorio

Para este trabajo se han utilizado como modelos animales la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, y embriones de pollo y ratón. Las cepas de *Drosophila* se han mantenido en medio estándar (*Drosophila, a laboratory manual*) (19).

Huevos fertilizados de pollo (*Gallus domesticus*) han sido incubados a 38 °C hasta llegar al estadio deseado según Hamburger y Hamilton (20). Para los experimentos en ratón se utilizaron embriones de la cepa ICR que fueron extraídos de la placenta en el día de gestación adecuado.

Clonaje

Se ha llevado a cabo el clonaje del gen ortólogo de *Mnb* en pollo. A partir del polyA-mRNA del cerebro embrionario de pollo se ha llevado a cabo el clonaje mediante RT-PCR. Partiendo de las secuencias conocidas de proteínas y transcritos *Mnb* en *Drosophila* y roedores (rata y ratón) se diseñó la pareja de cebadores (*primers*), DY5 y VAS, en zonas de secuencia conservadas entre especies. Así se amplificó un fragmento de 972 pares de bases. Con el fin de extender el clonaje de los cDNAs hacia el 3' y 5' mediante RACE, se diseñaron nuevos cebadores: NT, NT2, CT1, CT3, CT4 y CT5. La localización de los cebadores en el cDNA se puede ver en la Figura 1. Para asegurar una secuencia de consenso fiable se han secuenciado al menos tres clones por cada segmento de DNA amplificado y clonado.

Transgénicos de *Drosophila*

cDNAs completos de *Mnb*, previamente aislados de *Drosophila* (9), fueron insertados en el vector pUAST e inyectados en embriones (21). Así se generaron transgénicos que contienen inserciones de *Mnb* en los tres cromosomas.

Hibridaciones *in situ*

Para hibridaciones *in situ* se utilizaron sondas de DNA de doble cadena, marcadas con digoxigenina y sintetizadas por PCR. Para la hibridación *in situ* se utilizó un protocolo descrito anteriormente (22): fijación con paraformaldehído, tratamiento con proteinasa K, postfijación, prehibridación, hibridación, incubación con un anticuerpo anti-digoxigenina, revelado enzimático.

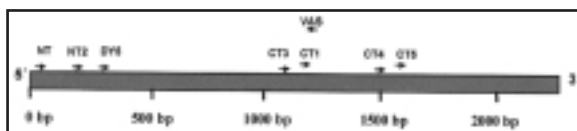


Figura 1. Esquema del clonaje del ortólogo de *Mnb* en pollo. Los números en negrita indican la distancia en pares de bases (bp) a lo largo de la longitud del cDNA en *Mnb* clonado. Las posiciones de los cebadores CT1, CT3, CT4, CT5, DY5, NT y NT2 por un lado (5' a 3') y VAS, en la cadena complementaria, así como su orientación a lo largo del cDNA están indicadas con flechas.

Inmunohistología

Para las tinciones inmunocitoquímicas de cerebro larvario de *Drosophila* se ha seguido un protocolo descrito por Cerón *et al.* (23).

RESULTADOS

Clonaje del ortólogo *Mnb* en pollo

Para obtener otro sistema experimental de vertebrados (además de ratón) se clonó el ortólogo de *Mnb* de pollo. El clonaje se llevó a cabo mediante técnicas de RT-PCR y RACE, según se ha descrito en «Material y métodos» e ilustrado en la Figura 1.

La secuencia de *Mnb* de pollo muestra un alto grado de similitud (aproximadamente 98%) con las proteínas *Mnb* de rata y humano. Igual que las proteínas de rata y humano, *Mnb* de pollo también contiene los típicos dominios de esta familia de protein-kinasas (16, 24): el dominio catalítico, un dominio de translocación nuclear, un dominio PEST, repeticiones de histidina y repeticiones de Ser/Thr. La comparación de la estructura de la proteína *Mnb* de vertebrados con la de *Drosophila* (Figura 2) confirma una alta conservación evo-

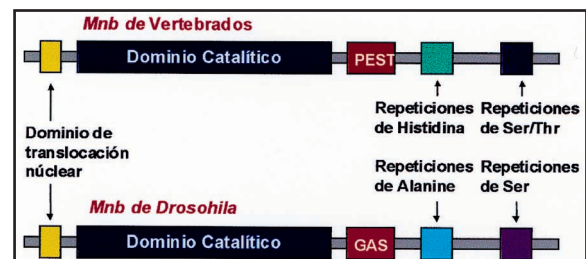


Figura 2. Dominios estructurales de la proteína *Mnb* en vertebrados y *Drosophila*. Obsérvese el paralelismo en la posición de dominios equivalentes en las estructuras de las proteínas *Mnb* de *Drosophila* y vertebrados. Los dominios catalíticos y los dominios de translocación nuclear están altamente conservados. Aparte de esto hay otros dominios equivalentes: GAS y PEST. *Mnb* de vertebrados contiene una región rica en prolina, ácido glutámico, serina y threonina (dominio PEST) de la cual se piensa que representa una señal de rápida degradación de la proteína (25). *Mnb* de *Drosophila* contiene una región rica en glicina, alanina y serina (dominio GAS) que puede cumplir el mismo propósito. Además, la proteína de vertebrados contiene repeticiones de histidina y de serina/threonina, cuyas funciones se desconocen hasta el momento. En su lugar, la proteína de *Drosophila* contiene repeticiones de alanina y de serina, respectivamente.

lutiva de este gen ya que se han mantenido en posiciones similares de la estructura dominios con función equivalente.

Expresión de *Mnb*

Los estudios de expresión de *Mnb* fueron llevados a cabo en pollo y ratón a lo largo del desarrollo embrionario.

En embriones tempranos de pollo y ratón se detecta expresión de *Mnb* en las zonas proliferativas del sistema nervioso, es decir, los neuroepitelios que darán lugar a las diferentes partes del cerebro como prosencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo y médula espinal, las placodas craneales y cresta neural (Figura 3). En embriones tardíos, el patrón de expresión es muy amplio y coincide con la diferenciación de grupos neuronales definidos, como por ejemplo en núcleos motores y sensoriales del rombencéfalo, células Purkinje del cerebelo (Figura 4), estrato óptico, diversos núcleos del diencefalo, hipocampo, células mitrales del bulbo olfatorio, hiperestriado y neostriado del pollo, así como en placa cortical del ratón.

Abordaje transgénico en *Drosophila*

La mosca del vinagre como modelo experimental es muy apropiado dado su corto ciclo de vida y su ampliamente demostrada versatilidad para realizar estudios genéticos del desarrollo.

Para generar moscas transgénicas se insertaron cDNAs completos de *Mnb*, previamente aislados de *Drosophila* (9), en el vector pUAST y se inyectaron en embriones (21). Estas moscas transgénicas UAS-*Mnb* contienen dosis extra de *Mnb* aunque su expresión es silente. Estas moscas se cruzan con moscas que expresan Gal4, un activador transcripcional de levadura que se une a las secuencias UAS y que está bajo el control un promotor de *heat shock* (*hs*) (Figura 5). La expresión de Gal4 se induce con un choque térmico y a su vez Gal4 es capaz de activar la transcripción de UAS-*Mnb*. Con esta estrategia se ha logrado sobreexpresar controladamente *Mnb* en el tejido y momento del desarrollo deseado.

Con estas moscas transgénicas de *Mnb* (UAS-*Mnb*, *hs*-Gal4) se han realizado experimentos de proliferación mediante marcaje con bromodeoxuridina (BrdU). Estos experimentos demuestran que la sobreexpresión de *Mnb* genera un efecto antiproliferativo sobre los neuroblastos (Figura 6). En paralelo se han llevado a cabo estudios histo-

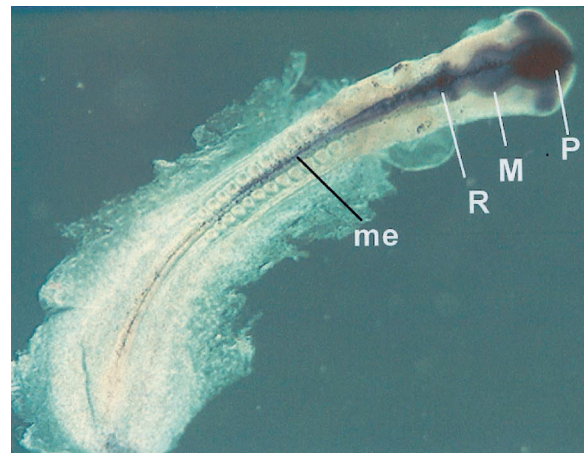


Figura 3. Expresión de *Mnb* en un embrión de pollo. Hibridación *in situ* de un embrión de estadio HH11. Se detecta expresión de *Mnb* (azul) en los neuroepitelios que darán lugar a prosencéfalo (P), mesencéfalo (M), rombencéfalo (R) y médula espinal (me).

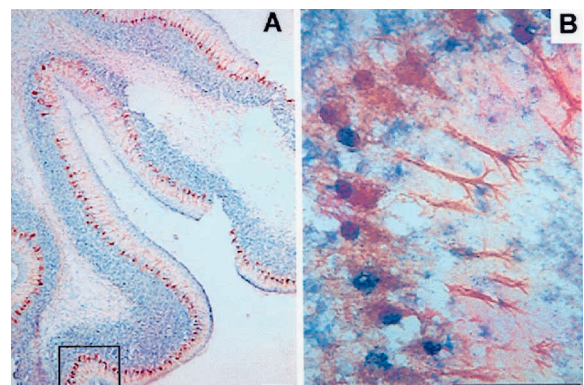


Figura 4. Expresión de *Mnb* en células Purkinje del cerebelo. La expresión de *Mnb* (azul) ha sido estudiada por hibridación *in situ* en combinación con inmunohistología de calbindina (marrón) en secciones flotantes del cerebelo de un embrión de pollo del estadio HH42. **A:** barra 100 μ m; **B:** ampliación del cuadro indicado en A, barra 50 μ m.

lógicos, de muerte neuronal e inmunocitoquímicos con marcadores de mitosis cuyos resultados son coherentes con el fenotipo antiproliferativo antes reseñado.

DISCUSIÓN

Modelos experimentales para el estudio del SD

Las primeras aproximaciones a este tema utilizaron técnicas de cultivos celulares de tejido de

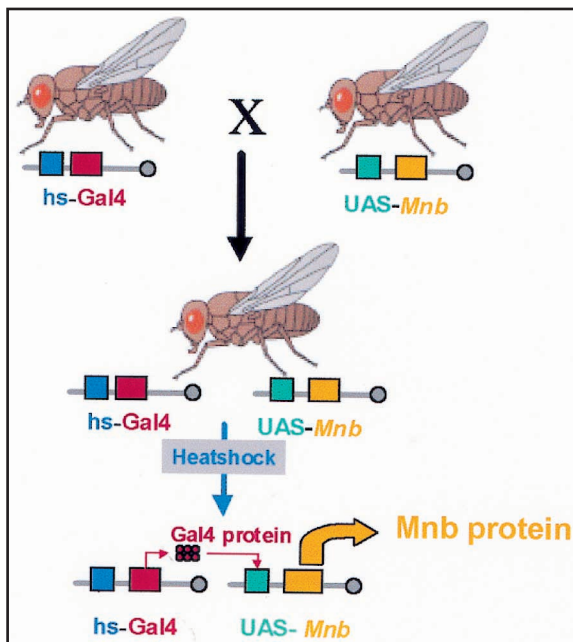


Figura 5. Sobreexpresión de *Mnb* mediante moscas transgénicas. Moscas transgénicas *UAS-Mnb* se cruzan con moscas *hs-Gal4* que tienen un activador transcripcional bajo el control de un promotor *heat shock* (*hs*). La expresión de Gal4 se induce tras un choque térmico. A su vez, Gal4 activa la expresión de *Mnb* al unirse a las secuencias reguladoras UAS.

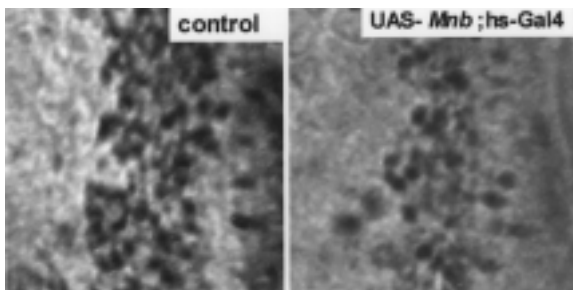


Figura 6. Estudios de proliferación en moscas transgénicas de *Mnb*. Marcaje con BrdU en la zona proliferativa del lóbulo óptico del sistema nervioso larvario en moscas transgénicas (*UAS-Mnb*, *hs-Gal4*) que sobreexpresan *Mnb* y en moscas control. Nótese la disminución del número de células marcadas en el lóbulo mutante. Barra = 100 μ m.

individuos trisómicos y en ellos se encontraron alteraciones en la proliferación celular (26) y apoptosis (27). El primer modelo animal en aparecer fue el del ratón trisómico para el cromosoma 16 (Ts16) que presenta algunos de los desórdenes característicos del SD (28). No obstante, la distribución génica entre el cromosoma 16 de ratón y el 21 humano es claramente diferente (4) y hay un

hecho claramente diferencial: la casi total letalidad de los fetos del ratón trisómico en comparación con la alta viabilidad de la trisomía humana. A pesar de ello éste ha sido un modelo de SD ampliamente usado en estas dos décadas, pero no ha sido hasta muy recientemente (29) que se han demostrado claras alteraciones en la neurogénesis en el desarrollo del cerebro de este ratón trisómico. Un modelo más reciente es el del ratón trisómico parcial del cromosoma 16 (Ts65Dn). En él han sido detectados fenotipos neurodegenerativos similares a los observados en cerebros de individuos con SD (30, 31) y alteraciones comportamentales (32), pero no alteraciones en el desarrollo del cerebro. Un tercer modelo es el ratón Ts108 Cje que tiene una translocación en el cromosoma 16 que parece anular algún gen de la región del SD; no obstante sólo se han detectado en este caso alteraciones comportamentales (33). Por último, se ha utilizado el abordaje de transgénicos para ver el efecto de la triplicación de segmentos genómicos de la DSCR. Así se ha demostrado que la triplicación de un segmento de unas 2 Mb que contiene tres genes (uno de ellos *MNB*) genera alteraciones en aprendizaje (18) pero sin fenotipos en el desarrollo del cerebro. La secuenciación del cromosoma 21 (5), al permitir la identificación de los genes contenidos de la región crítica para el SD (DSCR), ha cambiado las perspectivas de investigación. Ésta se está orientando hacia el estudio de la funcionalidad de los genes identificados que se localizan en la DSCR. En este sentido, se han generado recientemente ratones transgénicos (TgDyrk1A) que sobreexpresan *Dyrk1A* (*Mnb*). Estos ratones muestran defectos cognitivos y motores en adultos (34). Sin embargo, no se han descrito fenotipos en desarrollo del cerebro.

Nuevos modelos experimentales

Como se ha mencionado anteriormente, nuestro objetivo ha sido desarrollar nuevos modelos experimentales para estudiar la posible implicación del gen *Mnb* en las neuropatologías asociadas al SD. El hecho de que la sobreexpresión de *Mnb* durante las etapas proliferativas del desarrollo del cerebro de *Drosophila* genere un fenotipo antiproliferativo es de máxima relevancia porque es la primera base experimental sólida que, hasta donde llega nuestro conocimiento, se haya encontrado hasta ahora que puede explicar la disminución del número de neuronas que sufre durante el desarrollo el cerebro de individuos con SD. Para poder aplicar el embrión de pollo como modelo experimental, se ha clonado el ortólogo

de *Mnb* en pollo, que es un modelo muy versátil en embriología experimental. La alta homología estructural con la proteína *Mnb* de otros vertebrados y de *Drosophila* apunta a una alta conservación evolutiva de este gen y nos refuerzan en el uso de *Drosophila* como organismo modelos en estos estudios.

El patrón de expresión de *Mnb* durante el desarrollo del cerebro de vertebrados es muy característico e interesante. Presenta dos ondas de expresión durante el desarrollo que coinciden, en estadios tempranos, con la etapa de proliferación (Figura 3) en las zonas neuroepiteliales, y en estadios de desarrollo tardíos, con el comienzo de determinadas etapas en la diferenciación de grupos neuronales (Figura 4). Este patrón es muy sugerente de una implicación de *Mnb* en el déficit neuronal generado en el SD.

Por otro lado, el claro paralelismo entre patrones de división de los precursores neuroepiteliales comparados con el sistema modelo del lóbulo óptico de *Drosophila* que nosotros estamos desarrollando (23, 35) nos reafirman en la conservación funcional de *Mnb* tiene en términos evolutivos.

El cDNA completo de *Mnb* de humano ha sido subclonado en un vector apropiado con el fin de realizar experimentos de transfección *in vivo* en pollo, por ejemplo mediante electroporación de embriones *in ovo* para llevar a cabo estudios como proliferación y diferenciación neuronal. Esta aproximación tiene la ventaja de la rápida detección de la expresión del gen que se ha electroporado y de que se puede sobreexpresar el gen de interés en el tejido que se desee en el momento del desarrollo deseado. Además, en condiciones experimentales óptimas, la supervivencia de los embriones es alta, pues sólo se altera un tejido o región del embrión.

Adicionalmente, dada la capacidad que hemos observado en *Mnb* de translocarse al núcleo celular (16), se está estudiando la implicación de *Mnb/Dyrk* en la activación transcripcional y se ha demostrado su capacidad para generar cambios transcripcionales *in vitro* (observaciones no publicadas).

En resumen, las evidencias acumuladas en la literatura científica y por nuestros estudios sugieren fuertemente que *Mnb* es un gen que está implicado en diversas funciones a lo largo del desarrollo: proliferación en desarrollo temprano y diferenciación en desarrollo tardío. Así, el conjunto de resultados apunta a un papel evolutivamente conservado de *Mnb* y ayudan a elaborar una hipótesis para el posible papel de *Mnb* en algunas de las neuropatologías asociadas al síndrome de Down.

BIBLIOGRAFÍA

1. HOOK E B, *et al.* Chromosomal abnormality rates in amniocentesis and live-born infants. *JAMA*. 1983; 249: 2034-2038.
2. KORENBERG J R, CHEN X N, SCHIPPER R, SUN Z, GONSKY R, GERWEHR S, *et al.* Down Syndrome phenotypes: The consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 4997-5001.
3. RAHMANI Z, BLUOIN J L, CREAU-GOLDBERG P C, WATKINS J F, MATTEI M, POISSONIER M, *et al.* Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of DS. *PNAS*. 1989; 86: 5958-5962.
4. KOLA I, HERTZOG P J. Animal models on the biological function of genes of chromosome 21 and their role in the pathophysiology of Down's Syndrome. *Hum Mol Genet*. 1997; 6: 1713-1727.
5. HATTORI M, FUJIYAMA A, TAYLOR T D, WATANABE H, YADA T, KARK H S, *et al.* The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*. 2000; 405 (6784): 311-319.
6. CHRAST R, SCOTT H S, CHEN H, KUDOH J, ROSSIER C, MINOSHIMA S, *et al.* Cloning of two human homologs of the *Drosophila* single-minded gene SIM1 on chromosome 6q and SIM2 on 21q within the Down syndrome chromosomal region. *Genome Res*. 1997; 7 (6): 615-624.
7. EMA M, IKEGAMI S, HOSOYA T, MIMURA J, OHTANI H, NAKAO K, INOKUCHI K, KATSUKI M, FUJII-KARIYAMA Y. 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*. 1999; 8 (8): 1409-1415.
8. SCHMUCKER D, CLEMENS J C, SHU H, WORBY C A, XIAO J, MUDA M, *et al.* *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell*. 2000; 101 (6): 671-684.
9. TEJEDOR F, ZHU X R, KALTENBACH E, ACKERMANN A, BAUMANN A, CANAL I, *et al.* Minibrain: A new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron*. 1995; 14: 287-301.
10. HÄMMERLE B, VERA-SAMPER E, SPREICHER S, ARENCIBIA R, MARTÍNEZ S, TEJEDOR F J. *Mnb/Dyrk1A* is transiently expressed and asymmetrically segregated in neural progenitor cells before the onset of neurogenesis. *Dev Biol*. 2002; 246 (2): 259-273.
11. FISCHBACK K F, HEISEMBERG M. Neurogenetics and behavior in insects. *J Exp Biol*. 1984; 112: 65-93.
12. CERON J, HÄMMERLE B, MOYA F, TEJEDOR F J. Role of minibrain on postembryonic neuronal proliferation. *Proceedings of the CSHL Meeting on Neurobiology*. New York: Cold Spring Harbor, 1997.
13. KENTRUP H, BECKER W, HEUKELBACH J, WILMES A, SCHURMANN A, HUPPERTZ C, *et al.* *Dyrk*, a dual specific protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J Biol Chem*. 1996; 271: 3488-3495.
14. GUIMERA J, CASAS C, PUCHARC C, SOLANS A, DOMENECH A, PLANAS A, ASHLEY J, LOVETT M, ESTIVILL X, PRITCHARD M. A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the

- critical region. *Human Mol Genetics*. 1996; 5 (9): 1305-1310.
15. SHINDOH J, KUDOH H, MAEDA A, YAMAKI S, MINOSHIMA Y, SHIMIZU J, et al. Cloning of a human homolog of the Drosophila Minibrain/rat Dirk Gene from the Down Syndrome Critical region of chromosome 21. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 225: 92-99.
 16. BECKER W, WATZEL K, EIRMBTER K, WEBER Y, BRAUERS A, TEJEDOR F J, JOOST H G. Sequence characterization, subcellular localization and substrate specificity of Dyrk-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J Biol Chem*. 1998; 273 (40): 25893-25902.
 17. RAHMANI Z, LOPES C, RACHIDI M, DELABAR J M. Expression of the Mnb (Dyrk) protein in Adult and Embryonic Mouse tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 253: 514-518.
 18. SMITH D J, STEVENS M E, SUDANAGUNTA S P, BRONSON R T, MAKHINSON M, WATANABE A M, O'DELL T J, FUNG J, WEIER H U, CHENG J F, RUBIN E M. Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. *Nat Genet*. 1999; 16 (1): 8-9.
 19. ASHBURNER M. Stocks. En: *Drosophila: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989; 17-20.
 20. HAMBURGER V, HAMILTON H L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*. 1951; 88: 49-92.
 21. BRAND A, PERRIMON N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 1993; 118: 401-415.
 22. TAUTZ D, PFEILE C. A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in the Drosophila embryo reveals transitional control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma*. 1989; 98: 81-85.
 23. CERON J, GONZÁLEZ C, TEJEDOR F J. Patterns of cell division and expression of asymmetric cell fate determinants in the postembryonic neuroblast lineage of Drosophila. *Dev Biol*. 2001; 230: 125-138.
 24. BECKER W, JOOST H G. Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1999; 62: 1-17.
 25. ROGERS S, WELLS R, RECHTSTEINER M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*. 1986; 234: 364.
 26. SEGAL D J, MCCOY E E. Studies on Down's Syndrome in Tissue Culture. *J Cell Physiol*. 1974; 83: 85-90.
 27. BUSCIGLIO J, JANKER B A. Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature*. 1995; 378 (6559): 776-779.
 28. EPSTEIN C J, COX D R, EPSTEIN L B. Mouse trisomy 16: an animal model of human trisomy 21 (Down syndrome). *Ann N Y Acad Sci*. 1985; 450: 157-168.
 29. HAYDAR T F, NOWAKOWSKI R S, YAROWSKY P J, KRUEGER B K. Role of Founder Cell deficit and delayed Neurogenesis in Microencephaly of the Trisomy 16 Mouse. *J Neurosci*. 2000; 20: 4146-4151.
 30. HAYDAR T F, BLUE M E, MOLLIVER M E, KRUEGER B K, YAROWSKY P J. Consequences of trisomy 16 for mouse brain development: corticogenesis in a model of Down syndrome. *J Neurosci*. 1996; 16 (19): 6175-6182.
 31. HOLTZMAN D M, SANTUCCI D, KILBRIDGE J, CHUA-COUZENS J, FONTANA D J, DANIELS S E, JOHNSONS R M, CHEN K, SUN Y, CARLSON E, ALLEVA E, EPSTEIN C J, MOBLEY W C. Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93 (23): 13333-13338.
 32. ESCORIHUELA R M, FERNÁNDEZ-TERUEL A, VALLINA I F, BAAMONDE C, LUMBRERAS M A, DIERSSEN M, TOBENA A, FLÓREZ J. A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neurosci Lett*. 1995; 199 (6): 143-146.
 33. SAGO H, CARLSON E J, SMITH D J, KILBRIDGE J, RUBIN E M, MOBLEY W C, et al. Ts1Cj, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *PNAS*. 1998; 95 (11): 6256-6261.
 34. ALTAFAJ X, DIERSSEN M, BAAMONDE C, MARTI E, VISA J, GUIMERÁ J, et al. Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk 1A (*minibrain*), a murine model of Down's syndrome. *Human Molecular Genetics*. 2001; 10 (8): 1915-1923.
 35. COLONQUES J, HÄMMERLE B, BIERI G, CERON J, TEJEDOR F J. A comparative study of the patterns of division of neuroblasts at the proliferative centers of the larval optic lobes of Drosophila and neuroepithelial progenitors of the vertebrate CNS. *Int J Dev Biol*. 2001; 45 (Suppl 1): 181.