

Una nueva hipótesis para el origen del déficit neuronal y las alteraciones de la diferenciación neuronal asociadas al síndrome de Down: implicación del gen *Minibrain*

A new hypothesis for the neuronal deficit and the alterations in neuronal differentiation associated to Down syndrome: implication of the Minibrain gene

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

Hämmerle B.
Bieri G.
Elizalde C.
Colonques J.
Chulia J.
Galceran J.
Tejedor F. J.

RESUMEN

La disminución de neuronas, diversos defectos en la diferenciación neuronal y la aparición de síntomas neurodegenerativos están entre las alteraciones neuropatológicas que hacen del síndrome de Down (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)*.

Dos han sido los objetivos de este trabajo: estudiar si *Mnb* podría estar implicado en la diferenciación neuronal y ver si la sobreexpresión de *Mnb* tiene efectos sobre muerte neuronal. Paralelamente se han intentado ver la relaciones de estas funciones del gen *Mnb* con las neuropatologías asociadas al SD.

Experimentos llevados a cabo en modelos experimentales transgénicos demuestran que la sobreexpresión de *Mnb* genera muerte neuronal. Asimismo, los estudios de expresión de *Mnb* durante el desarrollo tardío del cerebro sugieren un papel de las *Mnb*-quinasas como elemento de señalización celular en el proceso de diferenciación neuronal. Todo ello contribuye a confeccionar una nueva hipótesis sobre las bases moleculares del déficit neuronal y las alteraciones de la diferenciación neuronal que se producen en el SD.

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

Hämmerle B, Bieri G, Elizalde C, Colonques J, Chulia J, Galceran J, Tejedor F J

Una nueva hipótesis para el origen del déficit neuronal y las alteraciones de la diferenciación neuronal asociadas al síndrome de Down: implicación del gen *Minibrain*
Mapfre Medicina, 2004; 15: 186-192

ABSTRACT

The decrease of neuronal number, diverse defects in neuronal differentiation, and neurodegeneration are among the neuropathologic alterations which make DS the most frequent cause of mental retardation. DS is originated by triplication of chromosome 21. Based on genetic studies and the sequencing of chromosome 21, the possible most relevant genes for DS generation have been identified. Among them *Minibrain (Mnb)* appears the most likely candidate to explain some DS neuropathologies.

Our work has approached two objectives: to study if *Mnb* could be involved in neuronal differentiation and find out if the overexpression of *Mnb* has an effect on cell death. In parallel, we have tried to establish the correlation of these functions of *Mnb* with the DS associated neuropathologies.

By using transgenic experimental models, we have found that overexpression of *Mnb* induces neuronal death. Also, the expression of *Mnb* during late brain development suggests a role of *Mnb*-kinases as an important signaling element within the process of neuronal differentiation. All together, these results contribute to build a new hypothesis for the molecular basis of the neuronal deficit and alterations of neuronal differentiation associated to DS.

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

Hämmerle B, Bieri G, Elizalde C, Colonques J, Chulia J, Galceran J, Tejedor F J

A new hypothesis for the neuronal deficit and the alterations in neuronal differentiation associated to Down syndrome: implication of the *Minibrain* gene
Mapfre Medicina, 2004; 15: 186-192

Correspondencia:

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

Fecha de recepción: 28 de enero de 2003

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. Aunque son muy diversas las anomalías y patofisiologías que genera, hemos de resaltar aquí que son las alteraciones neuropatológicas las que hacen del SD la causa principal de retraso mental. Entre estas neuropatologías cabe destacar la disminución en el número de neuronas en zonas definidas del cerebro, diversos defectos en la diferenciación neuronal 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. No obstante, 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 crítica denominada DSCR (*Down syndrome critical region*) (3). La reciente secuenciación del cromosoma 21 (4) ha permitido la identificación de los genes comprendidos dentro de la DSCR. A pesar de estos importantes avances, aun se desconocen las bases moleculares de las patologías del SD. La hipótesis más extensamente aceptada para la etiología del SD es que la sobreexpresión de algunos genes del cromosoma 21 (y las interacciones subsiguientes) contribuyen de forma conjunta a la generación de determinadas patologías, aunque no es descartable que haya alguna relación unívoca entre un determinado gen/patología (5). Es por ello fundamental el estudio de la función de los genes candidatos de la DSCR y de su posible función en el desarrollo del cerebro.

El gen *Minibrain* (*Mnb*) consta de una unidad de transcripción que produce por splicing alternativo una nueva familia de protein-quinasas. Nuestro grupo ha clonado y caracterizado el gen *Minibrain* (*Mnb*) de *Drosophila* (6). Los mutantes de *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 (6, 7). Por varios caminos, se han clonado posteriormente los genes homólogos de *Mnb*, *Dyrk1A* en rata (8), pollo (9), ratón (10) y *MNB* en humanos (11, 12). Recientemente, nuestro grupo, en colaboración con otros investigadores, ha demostrado que los transcritos de *Droso-*

phila 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 los agrupa en una familia génica bien conservada evolutivamente (13).

Son varios los datos experimentales que sugieren una implicación de *Mnb* en las neuropatologías del SD.

El gen *Mnb* en humanos, se localiza en la DSCR del cromosoma 21 (10-12).

Mnb se expresa en las regiones cerebrales más afectadas por las neuropatologías del SD (cerebelo, hipocampo, corteza cerebral).

Mnb se sobreexpresa en tejido cerebral fetal con SD (11).

En ratones transgénicos que sobreexpresan *Mnb* se han encontrado deficiencias comportamentales y alteraciones motoras (14, 15).

Todos ellos nos indujo hace unos años a iniciar estudios que intentaras relacionar las funciones de *Mnb* en el desarrollo del cerebro con determinadas neuropatologías asociadas al SD. En el curso de estos trabajos hemos demostrado que *Mnb* está claramente implicado en diversas funciones a lo largo del desarrollo del cerebro: proliferación y neurogénesis en etapas tempranas (9, 16)* y diferenciación neuronal en el desarrollo tardío (17).

Usando nuevos modelos experimentales *in vivo* que hemos recientemente generado (18), el presente trabajo aborda el análisis de la implicación de *Mnb* en la muerte neuronal durante el desarrollo del cerebro para estudiar si las bases moleculares de las neuropatologías del SD podrían residir en la alteración del gen *Mnb*. También se ha estudiado la localización subcelular de *Mnb* durante la etapa de diferenciación neuronal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de laboratorio

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

* COLONQUES J, CERON J, HÄMMERLE B, TEJEDOR F J (2003). *Mnb* regulates proliferation and neurogenesis in the postembryonic CNS (Manuscrito en preparación).

Huevos fertilizados de pollo (*Gallus domesticus*) han sido incubados a 38 °C hasta llegar al estadio deseado, según Hamburger y Hamilton (20).

Histología

Cerebros larvarios de *Drosophila* han sido disecados, fijados en paraformaldehído, tratados con tetróxido de osmio e incluidos en SSPURR según Tejedor y cols. (6). Cortes seriados semifinos han sido teñidos con azul de toluidina.

Inmunocitoquímica

Para las tinciones inmunocitoquímicas de rodajas de cerebro embrionario de pollo se ha seguido un protocolo descrito por Hämmerle y cols. (17). El análisis subcelular de las preparaciones ha sido llevado a cabo en un microscopio confocal Leica TCS-NT.

RESULTADOS

La sobreexpresión de *Mnb* durante el desarrollo del cerebro genera muerte neuronal

Con el fin de estudiar si una dosis extra de *Mnb*, durante el desarrollo del cerebro, tiene efectos sobre muerte celular se han utilizado moscas transgénicas que sobreexpresan *Mnb*. La generación de moscas transgénicas UAS-*Mnb* ha sido descrita anteriormente (18). Para poder sobreexpresar *Mnb* hay que cruzar las moscas transgénicas UAS-*Mnb* con moscas *hs-Gal4* que tienen al activador transcripcional Gal4 bajo el control de un promotor de *heat shock*. Para inducir la sobreexpresión en el momento de desarrollo deseado, se aplica un choque térmico que induce la expresión de Gal4 el cual, a su vez, activa la expresión de *Mnb* al unirse a las secuencias reguladoras UAS.

En este caso se ha inducido la sobreexpresión de *Mnb* durante toda la etapa proliferativa del desarrollo postembrionario del cerebro. Con los cerebros larvarios de estas moscas transgénicas se han hecho secciones de plástico seriadas y se han teñido con azul de toluidina que es una de las técnicas que se utilizan para detectar células picnóticas (21). Estas son células que se están muriendo y que morfológicamente se caracterizan por la condensación y fragmentación de su núcleo. El número de células picnóticas ha sido cuantificado

tanto en el caso de las moscas transgénicas como en las moscas control. Los resultados que hemos encontrado claramente muestran que la sobreexpresión de *Mnb* durante la etapa proliferativa del cerebro produce un claro aumento de muerte neuronal (Figura 1).

Expresión de *Mnb* durante la diferenciación neuronal

La expresión de *Mnb* en determinadas poblaciones neuronales durante el desarrollo tardío del cerebro de vertebrados (18) nos ha inducido a estudiar si *Mnb* podría estar implicado en la diferenciación neuronal. Por tanto, se ha abordado un estudio detallado de la localización subcelular de *Mnb* en relación con la diferenciación neuronal. Este estudio se ha llevado a cabo en embriones de pollo de distintas edades con métodos inmunocitoquímicos seguidos por un análisis de microscopía confocal usando como modelo las cé-

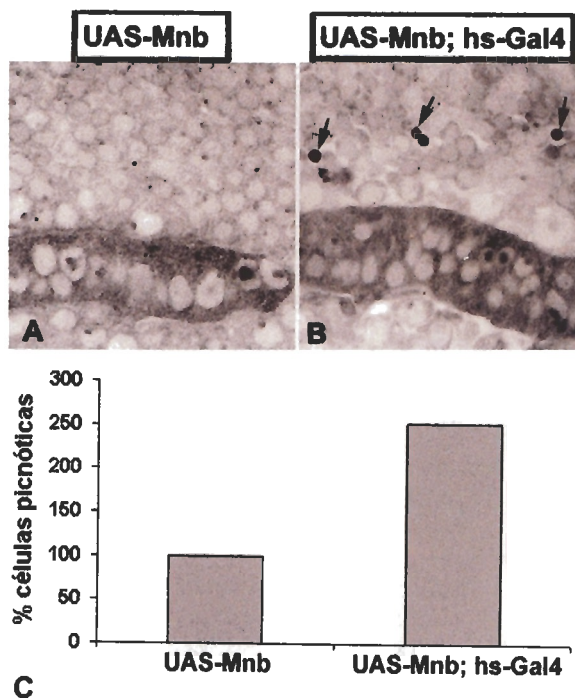


Figura 1. Estudios de muerte neuronal en moscas transgénicas *Mnb*. (A, B) Secciones frontales del lóbulo óptico del sistema nervioso larvario de moscas transgénicas (UAS-*Mnb*, *hs-Gal4*) que sobreexpresan *Mnb* y en moscas control (UAS-*Mnb*). Las células picnóticas están indicadas con flechas. (C) Análisis cuantitativo del número de células picnóticas en las mencionadas moscas. Obsérvese que en las moscas transgénicas hay un incremento de células picnóticas superior al 100% frente a la muerte neuronal natural de las moscas control.

lulas Purkinje del cerebelo. Se han elegido las células Purkinje para este estudio debido a su elaborado árbol dendrítico que facilita el análisis de la localización subcelular. Además es precisamente el cerebelo, junto con el hipocampo y la corteza cerebral, las zonas del cerebro más afectadas por las alteraciones neuropatológicas asociadas al SD (2, 22, 23). La expresión de *Mnb* precede a la formación del árbol dendrítico y se localiza mayoritariamente en los cuerpos celulares. Es en esa primera etapa cuando *Mnb* hemos encontrado que *Mnb* se transloca transitoriamente al núcleo en forma de *hot spots* (Figura 2), para luego localizarse en la dendrita en desarrollo (Figura 3). Posteriormente se extiende también hacia las ramificaciones del árbol dendrítico tan elaborado que caracteriza las células Purkinje.

Recientemente, se ha propuesto a la Dinamina 1 (Dyn1) como un posible sustrato de las Mnb-quinasas (24). Dado el papel de Dyn1 en tráfico de membranas y su relación con el citoesqueleto de actina y dado que *Mnb* colocalizaba con la actina en el árbol dendrítico (Figura 3), se decidió analizar si la Dyn1 se coexpresaba con *Mnb* en las células en diferenciación. Tal y como se muestra en la Figura 4, *Mnb* y Dyn1 colocalizan casi totalmente en el árbol dendrítico en desarrollo.

DISCUSIÓN

Se ha estudiado extensamente que los cerebros de personas con SD muestran unas caracte-

rísticas alteraciones morfológicas e histológicas como son un cerebro de menor tamaño que presenta disminución del número de neuronas en regiones cerebrales definidas (cerebelo, hipocampo y algunas capas de la corteza cerebral), diversas alteraciones de la diferenciación neuronal e incremento del número de astrocitos (2, 22, 23, 25). También está comúnmente aceptado que estas neuropatologías tienen su origen en alteraciones que se producen durante el desarrollo del cerebro. Así, el déficit neuronal podría explicarse por el retraso en el desarrollo, algún fallo en la prolifera-

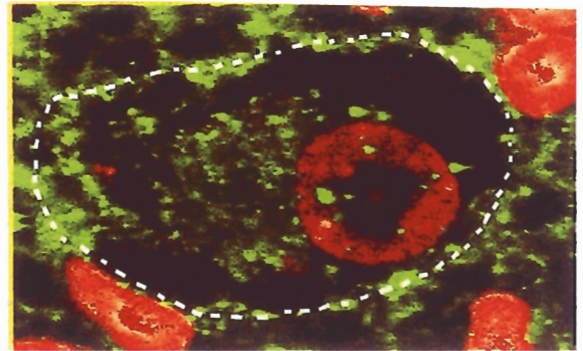


Figura 2. Localización subcelular de *Mnb* en una célula Purkinje de un embrión de pollo. Aunque *Mnb* (verde) se localiza mayoritariamente en el citoplasma y membrana (línea discontinua), nótese la presencia de *hot spots* de *Mnb* (verde) en el núcleo de la célula que esta contrateñido con un marcador nuclear (rojo). En esta etapa del desarrollo aún no se ha formado la dendrita apical por eso la célula tiene forma elipsoidal.

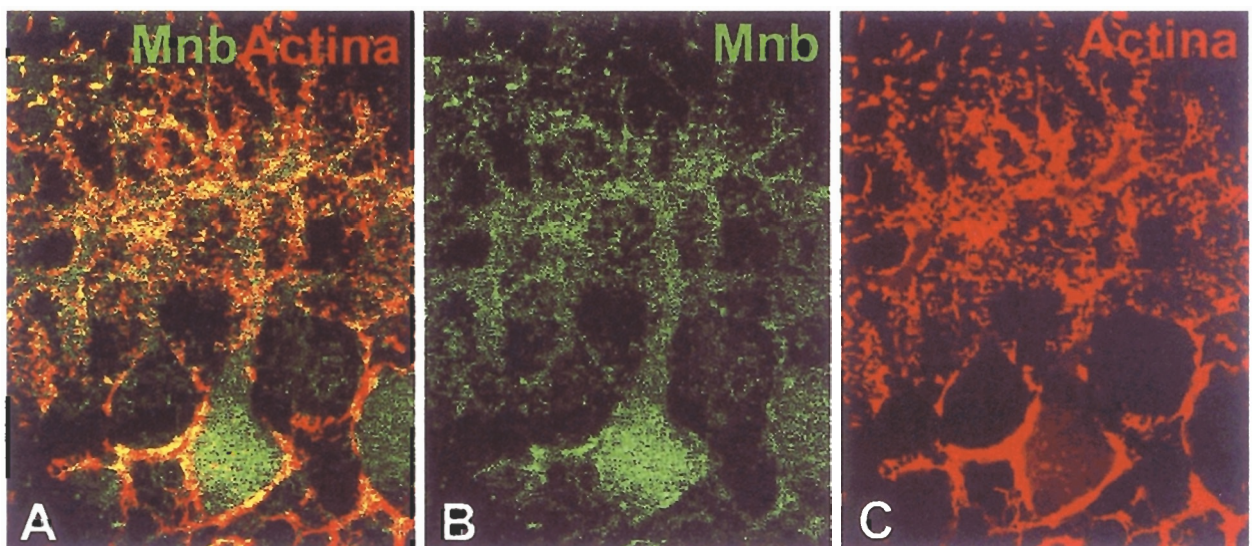


Figura 3. Expresión de *Mnb* en una célula Purkinje durante el desarrollo del árbol dendrítico. *Mnb* (verde) se localiza en la dendrita de una neurona de Purkinje cuya citoarquitectura se revela con un marcador del citoesqueleto actina (rojo)

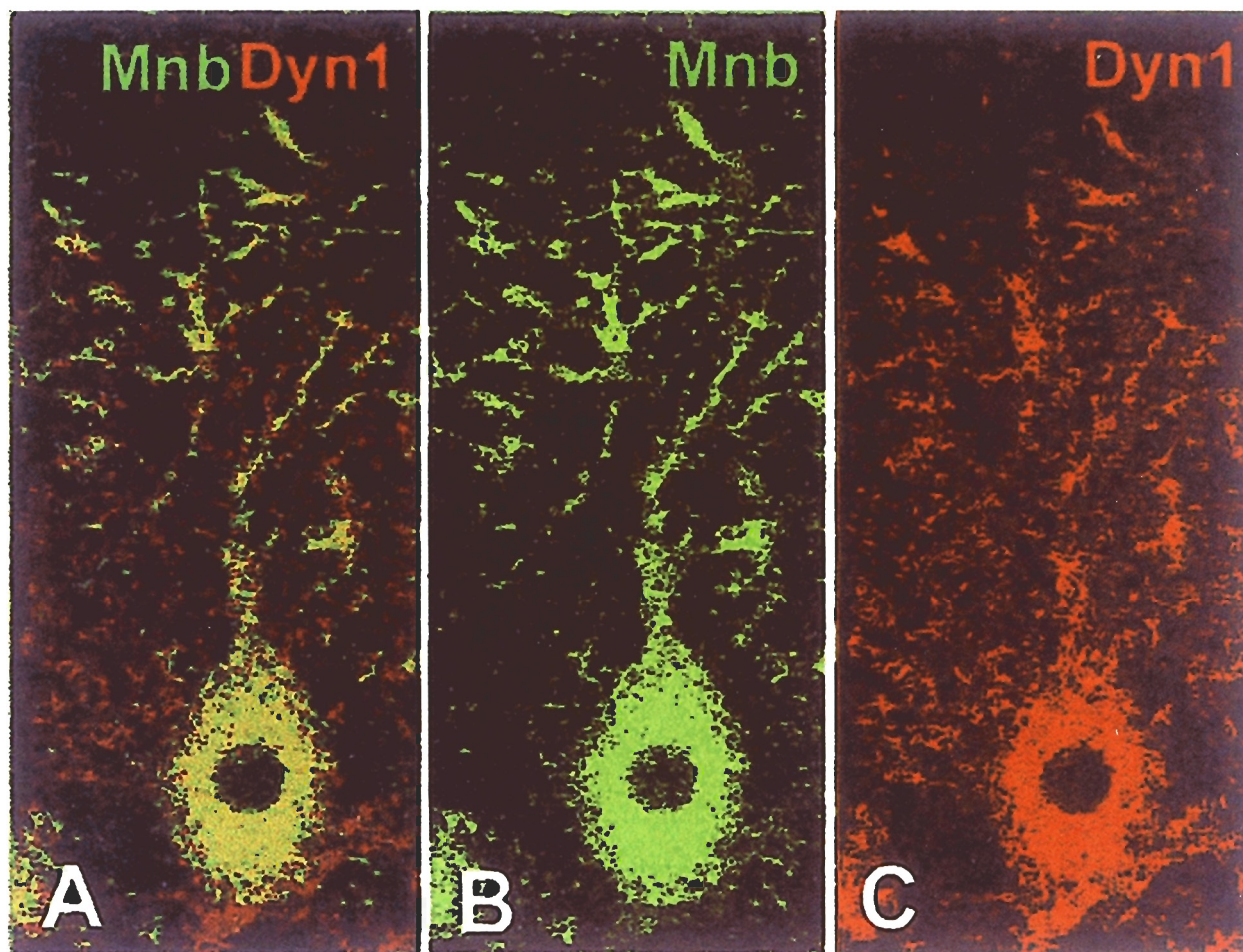


Figura 4. Colocalización de *Mnb* y Dinamina 1 (Dyn 1) en el árbol dendrítico de una célula de Purkinje en diferenciación.

ción celular o por muerte neuronal. El posible papel de *Mnb* como determinante de neurogénesis (9) sugiere que *Mnb* pueda estar implicado en la disminución del número de neuronas en el cerebro de SD. Evidencias genéticas en este sentido se han obtenido con moscas transgénicas, donde se ha demostrado que la sobreexpresión de *Mnb* durante las etapas proliferativas del cerebro genera un fenotipo antiproliferativo (18).

El control sobre el número de células en un organismo es regulado por un complicado balance entre proliferación y muerte celular (26, 27). De acuerdo con esto, en el presente trabajo, de nuevo utilizando moscas transgénicas como modelo experimental, nos hemos planteado si la sobreexpresión puede tener algún efecto sobre la muerte celular. Los resultados que hemos encontrado claramente muestran que la sobreexpresión de *Mnb* durante la etapa proliferativa del cerebro produce un claro aumento de muerte neuronal. Esta muerte se produce en células postmitóticas, lo

que sugiere que podría ser consecuencia de un mecanismo de control que ocurre durante el desarrollo para eliminar neuronas con una especificación errónea (26, 28, 29).

Por otro lado, la expresión de *Mnb* durante la diferenciación neuronal es muy interesante desde el punto de vista de la novedosa función de este gen en los procesos moleculares que subyacen al desarrollo dendrítico. Dentro de este contexto, la colocalización que hemos encontrado de *Mnb* con Dyn1 en el árbol dendrítico en desarrollo encaja muy bien con los resultados de un estudio *in vitro*, que proponen a la Dyn1 como sustrato de *Mnb* (24).

Asimismo, nuestro trabajo *in vivo* que demuestra la translocación transitoria de *Mnb* al núcleo celular corrobora una observación anterior *in vitro* (13). Estos resultados refuerzan la idea de que *Mnb* pueda ser un regulador transcripcional, propuesta que por ahora sólo proviene de estudios de fosforilación de varios factores de transcrip-

ción realizados *in vitro* (30, 31). También hay que señalar que nosotros hemos mostrado que la fosforilación de uno de esos factores (Gli1) por *Mnb* genera cambios transcripcionales (32).

La posible relación funcional de *Mnb* con el desarrollo del árbol dendrítico tiene una repercusión importante sobre la implicación de *Mnb* en el SD ya que hay abundante literatura que ha mostrado alteraciones en el desarrollo dendrítico en neuronas de cerebros de SD, especialmente en neuronas corticales y cerebelosas (22, 23, 33). Más aún, las anomalías dendríticas se encuentran entre los correlatos morfológicos más extendidos en los cerebros de personas con retrasos mentales (34).

En conclusión, los resultados aquí mostrados nos animan a proponer que la sobreexpresión de *Mnb* que se produce durante el desarrollo del cerebro de SD puede ser la causa de dos de las neuropatologías más características de este síndrome: el déficit neuronal y la disminución de la arborización dendrítica neuronal.

BIBLIOGRAFÍA

- HOOK E B, CROSS P K, SCHREINEMACHERS D M. Chromosomal abnormality rates in amniocentesis and live-born infants. *JAMA*. 1983 Apr 15; 249 (15): 2034-2038.
- 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 May 24; 91 (11): 4997-5001.
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989 Aug; 86 (15): 5958-5962.
- HATTORI M, FUJIYAMA A, TAYLOR T D, WATANABE H, YADA T, PARK H S, *et al*. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*. 2000 May 18; 405 (6784): 311-319.
- ANTONARAKIS S E. Chromosome 21: from sequence to applications. *Curr Opin Genet Dev*. 2001 Jun; 11 (3): 241-246.
- 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 Feb; 14 (2): 287-301.
- FISCHBACH K F, HEISENBERG M. Neurogenetics and behavior in insects. *J Exp Biol*. 1984; 112: 65-93.
- KENTRUP H, BECKER W, HEUKELBACH J, WILMES A, SCHURMANN A, HUPPERTZ C, *et al*. 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*. 1996 Feb 16; 271 (7): 3488-3495.
- HÄMMERLE B, VERA 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 Jun 15; 246 (2): 259-273.
- SONG W J, STERNBERG L R, KASTEN-SPORTES C, KEUREN M L, CHUNG S H, SLACK A C, *et al*. Isolation of human and murine homologues of the *Drosophila* Minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome critical region. *Genomics*. 1996 Dec 15; 38 (3): 331-339.
- GUIMERA J, CASAS C, PUCHARCOS C, SOLANS A, DOMENECH A, PLANAS A, *et al*. 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*. 1996 Sep; 5 (9): 1305-1310.
- 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.
- BECKER W, WATZEL K, EIRMBTER K, WEBER Y, BRAUERS A, TEJEDOR F J, *et al*. Sequence characterization, subcellular localization and substrate specificity of Dyrk-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J Biol Chem*. 1998 Oct 2; 273 (40): 25893-25902.
- SMITH D J, STEVENS M E, SUDANAGUNTA S P, BRONSON R T, MAKHINSON M, WATABE A M, O'DELL T J, FUNG J, WEIER H U, CHENG J F, RUBIN E M. Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. *Nat Genet*. 1997 May; 16 (1): 28-36.
- ALTAFAJ X, DIERSSSEN M, BAAMONDE C, MARTI E, VISA J, GUIMERA J, *et al*. Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk 1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum Mol Genet*. 2001 Sep 1; 10 (18): 1915-1923.
- CERÓN J, HÄMMERLE B, MOYA F, TEJEDOR F J. Role of minibrain on postembryonic neuronal proliferation. *Proceedings of the CSHL Meeting on Neurobiology*. Cold Spring Harbor, NY, USA, Sept 1997.
- HÄMMERLE B, CARNICERO A, ELIZALDE C, CERÓN J, MARTÍNEZ S, TEJEDOR F J. Expression Patterns and Subcellular Localization Implicate *Mnb/Dyrk1A* in Late Neuronal Differentiation and suggest a new role in Down Syndrome. *Eur J Neurosci*. 2003 Jun; 17 (11): 2277-2286.
- 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 (3): 210-216.
- ASHBURNER M. Stocks. En: Cold Spring Harbor (eds), *Drosophila: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989; pp 17-20.
- HAMBURGER V, HAMILTON H L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*. 1951; 88: 49-92.
- STADELMANN C, LASSMANN L. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res*. 2000 Jul; 301 (1): 19-31.

22. BECKER L, MITO T, TAKASHIMA S, ONODERA K. Growth and development of the brain in Down Syndrome. En: *The Morphogenesis of Down Syndrome*. New York: Wiley-Liss Inc, 1991; pp 133-152.
 23. COYLE J T, OSTER-GRANITE M L, GEARHART J D. The neurobiologic consequences of Down syndrome. *Brain Res Bull*. 1986 Jun; 16 (6): 773-787.
 24. CHEN-HWANG M C, CHEN H R, ELZINGA M, HWANG Y W. Dynamin is a minibrain kinase/dual specificity Yak1-related kinase 1A substrate. *J Biol Chem*. 2002 May 17; 277 (20): 17597-17604.
 25. ANTONARAKIS S E. 10 years of Genomics, chromosome 21, and Down syndrome. *Genomics*. 1998 Jul 1; 51 (1): 1-16.
 26. OPPENHEIM R W. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 1991; 14: 453-501.
 27. FOTEDAR R, DIEDERICH L, FOTEDAR A. Apoptosis and the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res*. 1996; 2: 147-163.
 28. MEIER P, FINCH A, EVAN G. Apoptosis in development. *Nature*. 2000 Oct 12; 407 (6805): 796-801.
 29. STELLER H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. 1995 Mar 10; 267 (5203): 1445-1449.
 30. WOODS Y L, COHEN P, BECKER W, JAKES R, GOEDERT M, WANG X, et al. The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site. *Biochem J*. 2001 May 1; 355 (Pt 3): 609-615.
 31. YANG E J, AHN Y S, CHUNG K C. Protein kinase Dyrk1 activates cAMP response element-binding protein during neuronal differentiation in hippocampal progenitor cells. *J Biol Chem*. 2001 Oct 26; 276 (43): 39819-39824.
 32. MAO J, MAYE P, KOGERMAN P, TEJEDOR F J, TOFTGARD R, XIE W, et al. Regulation of Gli1 transcriptional activity in the nucleus by Dyrk1. *J Biol Chem*. 2002 Sep 20; 277 (38): 35156-35161.
 33. BERSU E T, AHMAD F J, SCHWEI M J, BAAS P W. Cytoplasmic abnormalities in cultured cerebellar neurons from the trisomy 16 mouse. *Brain Res Dev Brain Res*. 1998 Jul 1; 109 (1): 115-120.
 34. KAUFMANN W E, MOSER H W. Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex*. 2000 Oct; 10 (10): 981-991.
-