



**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA**

**ESTUDIO DE LA mGluR-LTD Y LA MORFOLOGÍA  
SINÁPTICA EN EL HIPOCAMPO DEL RATÓN Ts1Cje Y  
ANÁLISIS DEL PROTEOMA SINÁPTICO. EFECTO DEL  
TRATAMIENTO CON RAPAMICINA.**

**TESIS DOCTORAL  
JESÚS DAVID URBANO GÁMEZ  
SEVILLA, 2021**



## **AGRADECIMIENTOS.**

Este trabajo ha implicado mucho tiempo y esfuerzo, ha sido un camino bastante largo y complicado. Aunque seré breve, para mí era imprescindible dejar en este texto un reflejo de mi gratitud a las personas que de una manera u otra han sido importantes en esta etapa y han contribuido a la consecución de esta Tesis Doctoral.

Antes de todo, considero fundamental agradecer a Mariluz el haberme acogido en su laboratorio siendo aún estudiante de grado. Estoy enormemente agradecido por su paciencia, su apoyo y su implicación a lo largo de estos años. Siempre estaré en deuda por confiar en mí y ayudarme a avanzar en este mundo tan particular que es la ciencia, concretamente la ciencia en España. Con este trabajo finaliza una etapa que ha sido una auténtica montaña rusa, en la que he aprendido mucho en muchos aspectos. Por todo, muchas gracias Mariluz.

Agradezco a mi padre, a mi madre y a mi hermano su apoyo incondicional, su cariño, su esfuerzo y su ayuda durante estos años. Ellos me han proporcionado la estabilidad y el sosiego en los momentos más críticos de esta etapa. Ya son 10 años los que llevo alejado de casa y no tenerlos en mi día a día es lo que más añoro estando en Sevilla. Ellos son mi referencia en todos sus significados y lo que más quiero, lo saben, pero es justo dejarlo por escrito. Aprovecho este párrafo también para dejar mi agradecimiento a mi familia: mis tíos/as, mis primos/as y mis abuelos/as, que me apoyaron en mis decisiones y siempre han sido un apoyo fundamental. Si bien no es el contexto en el que generalmente se aplica, la frase “Si he logrado ver más lejos es porque he subido a hombros de gigantes” siempre viene a mi mente al pensar en mi familia, ya que a ellos debo ser la persona que soy hoy.

También quería dejar patente mi agradecimiento a las personas del departamento de Fisiología médica y biofísica que me han ayudado durante estos años, muy particularmente a quienes han sido mis compañeros de laboratorio, Juanjo, Itziar y Macarena, a los que me une ahora una gran amistad. A Juanjo, muchas gracias por tus sabias palabras, por tu apoyo y tu ayuda, has sido un compañero excelente, eres un amigo enorme. A Itziar, la mejor consejera y una gran amiga, se quedan en mi memoria nuestras charlas en el animalario y tus palabras de alivio, has sido la voz amiga que siempre sabe qué decir. Y a Macarena, la mejor compañera de laboratorio y amiga, no hay día que no la eche de menos en Sevilla. A ella le agradezco mucho, le debo más y mejor no digo nada, que después me lo reprocha.

Gracias a mis amigos, a los de toda la vida, a Rocío, Fran y Fofó, ellos son la mejor descripción de lo que es la amistad, os agradezco todo el cariño y el apoyo que me dais, los grandes momentos que hemos compartido y las risas. Es un auténtico privilegio contar con vosotros y ojalá pudiésemos compartir más momentos del día a día.

Por supuesto, quiero agradecer también a los miembros de mi Bar preferido, ellos son el mayor tesoro que me dio la carrera. A Juan Antonio, Álvaro, Marina, Manolo, Pepi, Ismael, Susana, Carmen y Andrea. Todos ellos son ya imprescindibles y me han dado muchos de los mejores momentos de estos años. Aunque las circunstancias nos han tenido alejados, el tiempo no hace mella en nuestra amistad. Gracias por las risas, por estar presentes siempre y por esta gran amistad que nos une. Aquí añadido a mi querida Carmen Gordillo, a quien agradezco su cariño y bondad durante estos años.

No me olvido tampoco de Estefanía, Laura, Melania y Rodri, compañeros de máster y amigos que siguen presentes. En especial, agradezco mucho a Estefanía la maravillosa amistad que hemos compartido estos años.

En lo profesional, quiero agradecer a José Luis Nieto, Maksym Kopanitsa y Frank Hoffman su ayuda en mi toma de contacto con el mundo de la electrofisiología. No ha sido un camino fácil y estoy muy agradecido por su ayuda en un aspecto que considero fundamental, saber qué hay que saber.

Quiero aprovechar estas líneas también para agradecer al Grupo de Microsistemas de la ETSI la oportunidad de trabajar con ellos. Ha supuesto un estímulo, por el que estoy enormemente agradecido, en un momento complicado de mi vida.

Como punto anecdótico, pero no por ello menos sincero, agradezco a Javier Coronas, Javier Cansado y Pepe Colubi por su compañía en los largos días de laboratorio en los que la risa fue la mejor compañía.

Con esto termino, se me habrán olvidado nombres y, sin duda, faltan palabras, pero creo que lo importante queda dicho.



## ÍNDICE

<b>Lista de abreviaturas y términos</b>	<b>Pág. 1</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>Pág. 6</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>Pág. 7</b>
<b>1. Introducción.</b>	<b>Pág. 8</b>
1.1. El síndrome de Down.	Pág. 9
1.2. El hipocampo.	Pág. 13
1.2.1. Estructura del hipocampo.	Pág. 15
1.2.1.1. Giro Dentado.	Pág. 15
1.2.1.2. Cornu ammonis.	Pág. 16
1.2.2. Plasticidad en el hipocampo.	Pág. 16
1.2.2.1. Formas de plasticidad en el hipocampo.	Pág. 17
1.3. Ratones modelo de SD.	Pág. 20
1.3.1. Alteraciones de la plasticidad en los ratones Ts1Cje y Ts65Dn.	Pág. 21
1.3.2. Alteraciones de la morfología sináptica en los ratones Ts1Cje y Ts65Dn.	Pág. 23
1.4. LTD dependiente de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR-LTD).	Pág. 23
1.4.1. Papel fisiológico de la mGluR-LTD.	Pág. 23
1.4.2. Mecanismos de la mGluR-LTD.	Pág. 26
1.4.3. Participación de la síntesis de proteínas en la mGluR-LTD.	Pág. 29
1.4.3.1. Ruta de señalización mTOR en la mGluR-LTD.	Pág. 31
<b>2. Hipótesis y objetivos.</b>	<b>Pág. 34</b>
<b>3. Materiales y métodos.</b>	<b>Pág. 38</b>
3.1. Animales.	Pág. 39
3.2. Fármacos y tratamientos.	Pág. 40
3.3. Aislamiento de sinaptoneurosomas (SNs) de hipocampo.	Pág. 40
3.4. Análisis proteómico mediante iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantitation).	Pág. 42

<b>3.5.</b> Análisis de los datos proteómicos mediante PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) e IPA (Ingenuity Pathway Analysis).	<b>Pág. 43</b>
<b>3.6.</b> Preparación de extractos de proteína, electroforesis y Western blot.	<b>Pág. 44</b>
<b>3.7.</b> Electrofisiología en rodajas agudas de hipocampo.	<b>Pág. 46</b>
<b>3.8.</b> Tinción de Golgi.	<b>Pág. 48</b>
<b>4. Resultados.</b>	<b>Pág. 52</b>
<b>4.1.</b> Análisis proteómico de SNs de hipocampo de ratones control y Ts1Cje adultos, tratados y no con rapamicina.	<b>Pág. 53</b>
<b>4.2.</b> Análisis de la mGluR-LTD Gp I en el ratón Ts1Cje.	<b>Pág. 68</b>
<b>4.3.</b> Análisis de la densidad y morfología de espinas dendríticas en el hipocampo del ratón Ts1Cje y efecto de la rapamicina.	<b>Pág. 74</b>
<b>4.4.</b> Análisis de la mGluR-LTD Gp I en el ratón Ts1Cje tratado prenatalmente con rapamicina.	<b>Pág. 78</b>
<b>4.5.</b> Evaluación de los niveles de mTORC2 en el hipocampo de ratones Ts1Cje.	<b>Pág. 80</b>
<b>5. Discusión.</b>	<b>Pág. 82</b>
<b>5.1.</b> Alteraciones del proteoma sináptico en el hipocampo del ratón Ts1Cje adulto. Efecto de la rapamicina.	<b>Pág. 83</b>
<b>5.2.</b> Alteraciones de la mGluR-LTD en el hipocampo del ratón Ts1Cje.	<b>Pág. 87</b>
<b>5.3.</b> Alteraciones de la morfología de las espinas dendríticas en el hipocampo del ratón Ts1Cje.	<b>Pág. 90</b>
<b>5.4.</b> Efecto del tratamiento prenatal con rapamicina.	<b>Pág. 93</b>
<b>6. Conclusiones.</b>	<b>Pág. 98</b>
<b>7. Bibliografía.</b>	<b>Pág. 102</b>
<b>ANEXO I. Puesta a punto y optimización del sistema de electrofisiología MEA.</b>	<b>Pág. 126</b>
<b>I.I Puesta a punto y optimización del sistema MEA para su aplicación en rodajas agudas de hipocampo.</b>	<b>Pág. 126</b>
<b>I.II Dispositivos MEA (matriz de microelectrodos).</b>	<b>Pág. 126</b>
<b>I.III MEA plano vs. MEA 3D.</b>	<b>Pág. 127</b>
<b>ANEXO II. Material suplementario.</b>	<b>Pág. 130</b>

**ANEXO III. Publicación “Prenatal treatment with rapamycin restores enhanced hippocampal mGluR-LTD and mushroom spine size in a Down’s syndrome mouse model”.** Pág. 131

**ANEXO IV. Contribución en publicación “CPEB1 is overexpressed in neurons derived from Down syndrome IPSCs and in the hippocampus of the mouse model Ts1Cje”.** Pág. 132





## Lista de abreviaturas y términos.

<b>2-AG</b>	2-araquidonilglicerol/ <i>2-arachidonoylglycerol</i>
<b>4EBP1</b>	Proteína de unión a eIF4E 1/ <i>eIF4E Binding Protein 1</i>
<b>ACSF</b>	Líquido cefalorraquídeo artificial/ <i>Artificial Cerebrospinal Fluid</i>
<b>ACSFs</b>	ACSF con sustitución parcial de sodio por sacarosa
<b>Akt</b>	Proteína quinasa B/ <i>Protein Kinase B</i>
<b>AMPA</b>	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico/ <i><math>\alpha</math>-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic</i>
<b>AMPA</b>	Receptor de AMPA/ <i>AMPA receptor</i>
<b>APP</b>	Proteína precursora del amiloide/ <i>Amyloid Precursor Protein</i>
<b>BACE2</b>	Precursor de la $\beta$ -secretase 2/ <i><math>\beta</math>-secretase 2 precursor</i>
<b>BDNF</b>	Factor Neurotrófico derivado del cerebro/ <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
<b>BDNF-LTP</b>	LTP inducida por BDNF
<b>CA</b>	<i>Cornu ammonis</i>
<b>CaM</b>	Calmodulina/ <i>Calmodulin</i>
<b>CAMKII</b>	Proteína quinasa dependiente de $Ca^{2+}$ /calmodulina II/ <i><math>Ca^{2+}</math> /calmodulin-dependent protein kinase II</i>
<b>CASK</b>	Quinasa de serina dependiente de $Ca^{2+}$ /calmodulina/ <i><math>Ca^{2+}</math> /calmodulin dependent Serine Kinase (vertebrate Lin-2 homolog)</i>
<b>CB1R</b>	Receptor Cannabinoide tipo 1/ <i>Cannabinoid type-1 receptor</i>
<b>CREB</b>	Proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc/ <i>cAMP Response Element-Binding protein</i>
<b>CTNNA2</b>	Alfa catenina 2/ <i>Catenin alpha 2</i>
<b>DAG</b>	Diacilglicerol/ <i>Diacylglycerol</i>
<b>DEPTOR</b>	Proteína que interacciona con mTOR que contiene dominio DEP/ <i>DEP domain containing mTOR-interacting protein</i>
<b>DG</b>	Giro dentado
<b>DGL<math>\alpha</math></b>	Lipasa de diacilglicerol/ <i>Diacylglycerol lipase</i>
<b>DHPG</b>	(S)-3,5-Dihidroxifenilglicina/ <i>(S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine</i>
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotido trifosfato/ <i>Deoxyribonucleotide Triphosphate</i>
<b>DOCK3</b>	Proteína dedicador de citoquinesis 3/ <i>Dedicator of cytokinesis protein 3</i>
<b>DSCAM</b>	Molécula de adhesión celular del Síndrome de Down/ <i>Down Syndrome Cell Adhesion Molecule</i>
<b>DTT</b>	Ditiotreitol/ <i>Dithiothreitol</i>
<b>DYRK1A</b>	Quinasa 1A regulada por fosforilación de tirosina de doble especificidad/ <i>Dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A</i>
<b>E(nº)</b>	Día de gestación embrionaria (nº)
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminetetraacético/ <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<b>eEF2</b>	Factor de elongación de la traducción eucariótica/ <i>eukariotic translation Elongation Factor 2</i>
<b>eIF4E</b>	Factor 4E de iniciación de la traducción eucariótica/ <i>eukariotic translation Initiation Factor 4E</i>
<b>EOAD</b>	Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano/ <i>Early Onset Alzheimer Disease</i>
<b>EPSP</b>	Potencial postsináptico excitatorio/ <i>Excitatory Postsynaptic Potential</i>
<b>ER</b>	Retículo Endoplásmico/ <i>Endoplasmic reticulum</i>
<b>ERK</b>	Proteína quinasa regulada por señal extracelular/ <i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i>
<b>FDR</b>	Tasa de descubrimientos falsos/ <i>False Discovery Rate</i>

<b>fEPSP</b>	Potencial postsináptico excitatorio de campo/ <i>field Excitatory Post-Synaptic Potential</i>
<b>FKBP12</b>	Proteína de unión a FK506 de 12 kDa/ <i>12 kDa FK506 Binding Protein</i>
<b>FKBP12.6</b>	Proteína de unión a FK506 12.6/ <i>FK506 Binding Protein 12.6</i>
<b>FKBP1B</b>	Proteína de unión a FK506 1B/ <i>FK506 Binding Protein 1B</i>
<b>FKBPs</b>	Proteínas de unión a FK506/ <i>FK506 Binding Proteins</i>
<b>FMR1</b>	Discapacidad intelectual del Síndrome de X frágil 1/ <i>Fragile X Mental Retardation 1</i>
<b>FMRP</b>	Proteína asociada a la discapacidad intelectual del Síndrome de X frágil/ <i>Fragile X Mental Retardation Protein</i>
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico/ <i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid</i>
<b>GIRK</b>	Canal de potasio de rectificación interna acoplado a proteína G/ <i>G-protein-coupled Inwardly Rectifying Potassium channel</i>
<b>GluA2</b>	Subunidad 2 del receptor ionotrópico de glutamato tipo AMPA/ <i>Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2</i>
<b>GluA4</b>	Subunidad 4 del receptor ionotrópico de glutamato tipo AMPA/ <i>Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4</i>
<b>GRIN1</b>	Subunidad 1 del receptor ionotrópico de glutamato tipo NMDA/ <i>Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1</i>
<b>GRIN2B</b>	Subunidad 2B del receptor ionotrópico de glutamato tipo NMDA/ <i>Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B</i>
<b>GRM5</b>	Receptor Metabotrópico de Glutamato 5/ <i>Glutamate Metabotropic Receptor 5</i>
<b>HFS</b>	Estimulación de alta frecuencia/ <i>High Frequency Stimulation</i>
<b>HFS-LTP</b>	LTP inducida por estimulación de alta frecuencia
<b>HOMER</b>	Proteína Homer 1/ <i>Homer protein 1</i>
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano/ <i>Horseradish Peroxidase</i>
<b>HS</b>	Solución de HEPES/ <i>HEPES Solution</i>
<b>HSA21</b>	Cromosoma 21 humano
<b>IP3</b>	Inositol-1,4,5-trifosfato/ <i>inositol-1,4,5-triphosphate</i>
<b>IPA</b>	Análisis de rutas de Ingenuity/ <i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
<b>IPSC</b>	Corriente postsináptica inhibitoria/ <i>Inhibitory Postsynaptic Current</i>
<b>iTRAQ</b>	Etiqueta isobárica para la cuantificación relativa y absoluta/ <i>isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation</i>
<b>JNK</b>	Quinasa N-terminal de c-Jun/ <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
<b>KIF17</b>	Miembro 17 de la familia kinesin/ <i>Kinesin family member 17</i>
<b>LC3B-I/-II</b>	Cadena ligera $\beta 3$ de la proteína asociada a microtúbulos 1A/1B I y II/ <i>Microtubule-associated protein 1A/1B Light Chain <math>\beta 3</math> I y II</i>
<b>LFS</b>	Estimulación de baja frecuencia/ <i>Low Frequency Stimulation</i>
<b>LFS-LTD</b>	LTD inducida por estimulación de baja frecuencia
<b>LIN7A</b>	Homólogo A de Lin-7/ <i>Lin-7 homolog A</i>
<b>LLAI</b>	Leucemia linfoblástica aguda en la infancia
<b>LM</b>	Leucemia megacariocítica
<b>LMA</b>	Leucemia mieloide aguda
<b>LTD</b>	Depresión a largo plazo/ <i>Long Term Depression</i>
<b>LTP</b>	Potenciación a largo plazo/ <i>Long Term Potentiation</i>
<b>MALS1</b>	Proteína de mamíferos Lin-7 1/ <i>Mammalian Lin-7 protein 1</i>
<b>Marcks</b>	Sustrato de la proteína quinasa C rico en alanina miristolada/ <i>Myristoylated alanine rich protein kinase C substrate</i>
<b>MEA</b>	Matriz de microelectrodos/ <i>Microelectrode Array</i>
<b>MEA 3D</b>	MEA de electrodos tridimensionales

<b>MEK</b>	Quinasa de la proteína quinasa activada por mitógeno/ <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
<b>mGluR</b>	Receptor metabotrópico de glutamato/ <i>metabotropic Glutamate Receptor</i>
<b>mGluR Gp I</b>	Receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I/ <i>metabotropic Glutamate Receptor group I</i>
<b>mGluR1</b>	Receptor metabotrópico de glutamato 1/ <i>metabotropic Glutamate Receptor 1</i>
<b>mGluR5</b>	Receptor metabotrópico de glutamato 5/ <i>metabotropic Glutamate Receptor 5</i>
<b>mGluR-LTD</b>	LTD dependiente de mGluR
<b>mGluR-LTD Gp1</b>	LTD asociada a los mGluR del grupo 1
<b>mGluR-LTP</b>	LTP dependiente de mGluR
<b>mGluR-LTP(A)</b>	LTP dependiente de mGluR mediada por AMPAR
<b>mGluR-LTP(N)</b>	LTP dependiente de mGluR mediada por NMDAR
<b>Mint1</b>	Proteína que interacciona con Munc-18 1 (homólogo en vertebrados de Lin-10)/ <i>Munc-18-interacting protein 1 (vertebrate Lin-10 homolog)</i>
<b>mLST8</b>	Proteína letal 8 en mamíferos con SEC13/ <i>mammalian lethal with sec13 protein 8</i>
<b>MMU16</b>	Cromosoma 16 murino
<b>MNK1/2</b>	Serina/treonina quinasa 1 y 2 de interacción con MAP quinasa/ <i>MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1 y 2</i>
<b>MOCA</b>	Modificador de la adhesión celular/ <i>Modifier Of Cell Adhesion</i>
<b>mSIN1</b>	Proteína mamífera de interacción con MAP quinasa activada por estrés/ <i>mammalian stress-activated MAP kinase-interacting protein 1</i>
<b>mTOR</b>	Diana de la rapamicina en mamíferos/ <i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
<b>mTORC1</b>	Complejo 1 de mTOR
<b>mTORC2</b>	Complejo 2 de mTOR
<b>Mx1</b>	GTPasa tipo dinamina MX 1/ <i>MX Dynamin Like GTPase 1</i>
<b>NMDA</b>	N-Metil-D-Aspartato/ <i>N-Methyl-D-Aspartate</i>
<b>NMDAR</b>	Receptor de NMDA/ <i>NMDA receptor</i>
<b>NMDAR-LTD</b>	LTD dependiente de NMDAR
<b>NMDAR-LTP</b>	LTP dependiente de NMDAR
<b>NOR</b>	Reconocimiento de objetos nuevos/ <i>Novel Object Recognition</i>
<b>NR1</b>	Subunidad 1 del receptor ionotrópico de glutamato tipo NMDA/ <i>Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1</i>
<b>NR2A</b>	Subunidad 2A del receptor ionotrópico de glutamato tipo NMDA/ <i>Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A</i>
<b>NR2B</b>	Subunidad 2B del receptor ionotrópico de glutamato tipo NMDA/ <i>Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B</i>
<b>OGB</b>	Tampón de gradiente de Optiprep™/ <i>Optiprep™ Gradient Buffer</i>
<b>OWS</b>	Solución de trabajo Optiprep™/ <i>Optiprep™ Working Solution</i>
<b>P(nº)</b>	Día postnatal (nº)
<b>P70S6K</b>	Quinasa de la proteína ribosomal S6 de 70-kDa/ <i>70-kDa ribosomal protein S6 kinase</i>
<b>P90S6K</b>	Quinasa de la proteína ribosomal S6 de 90-kDa/ <i>90-kDa ribosomal protein S6 kinase</i>
<b>PAK</b>	Serina/treonina proteína quinasa/ <i>Serine/threonine-protein Kinase</i>
<b>PANTHER</b>	Análisis de proteínas a través de las relaciones evolutivas/ <i>Protein Analysis Through Evolutionary Relationships</i>

<b>PBS</b>	Solución salina tamponada con fosfato/ <i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa/ <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PK1/2</b>	Quinasa dependiente de fosfoinositol 1 y 2/ <i>Phosphoinositide-Dependent Kinase 1 y 2</i>
<b>PFN2</b>	Profilina 2/ <i>Profilin-2</i>
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3 quinasa/ <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
<b>PIKE-L</b>	Potenciador largo de PI3K/ <i>PI3-Kinase Enhancer Long</i>
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato/ <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i>
<b>PIP3</b>	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato/ <i>Phosphatidylinositol-3,4,5-btrisphosphate</i>
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C/ <i>Protein kinase C</i>
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C/ <i>Phospholipase C</i>
<b>PLC<math>\beta</math></b>	Fosfolipasa C $\beta$ / <i>Phospholipase C<math>\beta</math></i>
<b>PP2A</b>	Proteína fosfatasa 2A/ <i>Protein Phosphatase 2A</i>
<b>PPF</b>	Facilitación de pulso pareado/ <i>Paired Pulse Facilitation</i>
<b>PRAS40</b>	Sustrato de Akt de 40 kDa rico en prolina/ <i>Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa</i>
<b>pro-BDNF</b>	Proteína precursora de BDNF/ <i>Pro-Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
<b>PROTOR 1 y 2</b>	Proteínas observados con RICTOR 1 y 2/ <i>Proteins Observed with RICTOR 1 y 2</i>
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno/ <i>Polyvinylidene Fluoride</i>
<b>Rac1</b>	Sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionado con Ras/ <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
<b>RAP2B</b>	RAP2B, miembro de la familia de oncogenes RAS/ <i>RAP2B, member of RAS oncogene family</i>
<b>RAPA</b>	Rapamicina/ <i>Rapamycin</i>
<b>RAPTOR</b>	Proteína asociada a la regulación de mTOR/ <i>Regulatory-Associated Protein of mTOR</i>
<b>RCAN1</b>	Regulador de calcineurina 1/ <i>Regulator of Calcineurin 1</i>
<b>receptor GABA-A</b>	Receptor de Ácido $\gamma$ -aminobutírico A/ <i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid receptor A</i>
<b>receptor GABA-B</b>	Receptor de Ácido $\gamma$ -aminobutírico B/ <i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid receptor B</i>
<b>RHEB</b>	Homólogo de Ras enriquecido en cerebro/ <i>Ras Homolog Enriched in Brain</i>
<b>RICTOR</b>	Compañero de mTOR insensible a rapamicina/ <i>Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR</i>
<b>RRID</b>	Identificador de recursos de investigación/ <i>Research Resource Identifier</i>
<b>RT</b>	Temperatura ambiente (22-25°C)/ <i>Room Temperature</i>
<b>RYR2</b>	Receptor de Rianodina 2/ <i>Ryanodine Receptor 2</i>
<b>s. oriens</b>	<i>Stratum oriens</i>
<b>s. pyramidale</b>	<i>Stratum pyramidale</i>
<b>s. radiatum</b>	<i>Stratum radiatum</i>
<b>SB</b>	Tampón de sinaptoneurosomas/ <i>Synaptoneurosome Buffer</i>
<b>SD</b>	Síndrome de Down
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico/ <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
<b>SDS-PAGE</b>	Sulfato de dodecilo sódico-Electroforesis en gel de poliacrilamida/ <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
<b>SEM</b>	Error estándar de la media/ <i>Standard Error of the Mean</i>
<b>SNs</b>	Sinaptoneurosomas
<b>SOD1</b>	Superoxido dismutasa 1/ <i>Superoxide Dismutase 1</i>

<b>SPTAN1</b>	Espectrina alfa, no eritrocítica 1/ <i>Spectrin alpha, non-erythrocytic 1</i>
<b>SRC</b>	SRC proto-oncogen, tirosina quinasa no receptora/ <i>SRC proto-oncogen, non-receptor tyrosine kinase</i>
<b>STX1B</b>	Sintaxina 1B/ <i>Syntaxin-1B</i>
<b>SULT4A1</b>	Sulfotransferasa 4A1/ <i>Sulfotransferase 4A1</i>
<b>TBS-T</b>	Solución salina tamponada con Tris-Tween/ <i>Tris-Buffered Saline-Tween</i>
<b>TGX</b>	<i>Tris-Glycine extended</i>
<b>Tiam1</b>	Proteína 1 inductora de invasión y metástasis del linfoma de células T/ <i>T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1</i>
<b>TOM20</b>	Translocasa de la membrana externa mitocondrial 20/ <i>Translocase Outer Mitochondrial membrane 20</i>
<b>TrkB</b>	Receptor quinasa B de tropomiosina/ <i>Tropomyosin receptor kinase B</i>
<b>TRP</b>	Receptor de Potencial Transitorio/ <i>Transient Receptor Potential</i>
<b>TRPV1</b>	Receptor de potencial transitorio vaniloide tipo 1/ <i>Transient Receptor Potential Vanilloid type 1</i>
<b>TSC1 y 2</b>	Complejo supresor de tumores 1 y 2/ <i>Tumor Supresor Complex 1 y 2</i>
<b>VELI1</b>	Homólogo A de Lin-7/ <i>Lin-7 homolog A</i>
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>
<b>WT</b>	Ratón silvestre/ <i>Wild Type</i>
<b>X11α</b>	Homólogo en mamíferos de Lin-10/ <i>Mammalian Lin-10 homolog</i>

## Lista de figuras.

<b>Figura 1</b>	Distribución de los genes y pseudogenes en el HSA21.	Pág. 10
<b>Figura 2</b>	Clasificación de los genes del HSA21 en base a su función	Pág. 11
<b>Figura 3</b>	Patologías asociadas al SD.	Pág. 12
<b>Figura 4</b>	Localización del hipocampo en el cerebro de roedores y humanos, y estructura observada en la sección transversal a su eje (en hipocampo de rata).	Pág. 14
<b>Figura 5</b>	Circuito trisináptico del hipocampo.	Pág. 15
<b>Figura 6</b>	Modelos murinos de SD.	Pág. 21
<b>Figura 7</b>	Rutas implicadas en la mGluR-LTD dependiente de la traducción local de proteínas.	Pág. 30
<b>Figura 8</b>	Protocolo de aislamiento de SNs.	Pág. 41
<b>Figura 9</b>	Rodaja de hipocampo en el dispositivo MEA y actividad eléctrica detectada en respuesta a estímulo.	Pág. 47
<b>Figura 10</b>	Efecto del DHPG sobre el fEPSP en la región <i>stratum radiatum</i> de la CA1 del hipocampo.	Pág. 48
<b>Figura 11</b>	Conteo manual de espinas dendríticas.	Pág. 49
<b>Figura 12</b>	Esquema del tratamiento de ratones adultos con rapamicina previo al aislamiento de SNs de hipocampo.	Pág. 54
<b>Figura 13</b>	Test de sobre-representación PANTHER de las proteínas identificadas por iTRAQ en muestras de SNs de hipocampo sometidas a análisis proteómico.	Pág. 55
<b>Figura 14</b>	Diagrama de Venn de las proteínas desreguladas en SNs de hipocampo de ratones Ts1Cje y WT tratados con rapamicina.	Pág. 64
<b>Figura 15</b>	Rutas canónicas establecidas por IPA afectadas en SNs Ts1Cje.	Pág. 65
<b>Figura 16</b>	Cuantificación de la proteína LC3B-II en el hipocampo de ratones WT y Ts1Cje.	Pág. 66
<b>Figura 17</b>	Cuantificación de la proteína TOM20 en el hipocampo de ratones WT y Ts1Cje.	Pág. 67
<b>Figura 18</b>	mGluR-LTD en rodajas de hipocampo WT y Ts1Cje.	Pág. 74
<b>Figura 19</b>	Distribución del porcentaje de espinas mushroom agrupadas por diámetro de la cabeza en ratones WT y Ts1Cje sin tratar, o tratados prenatalmente con rapamicina (RAPA).	Pág. 77
<b>Figura 20</b>	mGluR-LTD en rodajas de hipocampo de ratón Ts1Cje tratado prenatalmente con rapamicina.	Pág. 78
<b>Figura 21</b>	mGluR-LTD en rodajas de hipocampo de ratón silvestre tratado prenatalmente con rapamicina.	Pág. 79
<b>Figura 22</b>	Efecto del DHPG en el fEPSP tras 5 minutos desde el inicio del tratamiento.	Pág. 80
<b>Figura 23</b>	Cuantificación de la proteína RICTOR en el hipocampo de ratones WT y Ts1Cje con y sin tratamiento de DHPG.	Pág. 81
<b>Figura 24</b>	Alteraciones de la morfología sináptica y a nivel de proteínas en la sinapsis del hipocampo del ratón Ts1Cje y efecto del tratamiento con rapamicina.	Pág. 95
<b>Figura 25</b>	MEA plano.	Pág. 127
<b>Figura 26</b>	MEA 3D.	Pág. 128

## Lista de tablas.

<b>Tabla 1</b>	Transmisión basal y plasticidad sináptica en el hipocampo en los ratones modelos de SD Ts65Dn y Ts1Cje.	Pág. 25
<b>Tabla 2</b>	Características morfológicas de las sinapsis en el hipocampo de los ratones Ts65Dn y Ts1Cje.	Pág. 26
<b>Tabla 3</b>	Mecanismos implicados en la mGluR-LTD.	Pág. 28
<b>Tabla 4</b>	Proteínas afectadas en SNs de hipocampo de ratones Ts1Cje, comparando con SNs WT.	Pág. 56
<b>Tabla 5</b>	Proteínas afectadas en SNs de hipocampo de ratones Ts1Cje tratados con rapamicina (Ts1Cje RAPA), comparando con SNs WT sin tratar.	Pág. 59
<b>Tabla 6</b>	Proteínas afectadas en SNs de hipocampo de ratones WT tratados con rapamicina (WT RAPA), comparando con SNs WT sin tratar.	Pág. 61
<b>Tabla 7</b>	Proteínas implicadas en rutas mitocondriales afectadas en SNs de hipocampo de ratones Ts1Cje.	Pág. 69
<b>Tabla 8</b>	Proteínas implicadas en rutas de plasticidad sináptica afectadas en SNs de hipocampo de ratones Ts1Cje.	Pág. 72
<b>Tabla 9</b>	Comparación de los porcentajes de filopodios, espinas <i>stubby</i> y <i>mushroom</i> en las dendritas secundarias de neuronas de la región apical del <i>stratum radiatum</i> en ratones WT y Ts1Cje sin tratar y tratados prenatalmente con rapamicina (RAPA).	Pág. 76



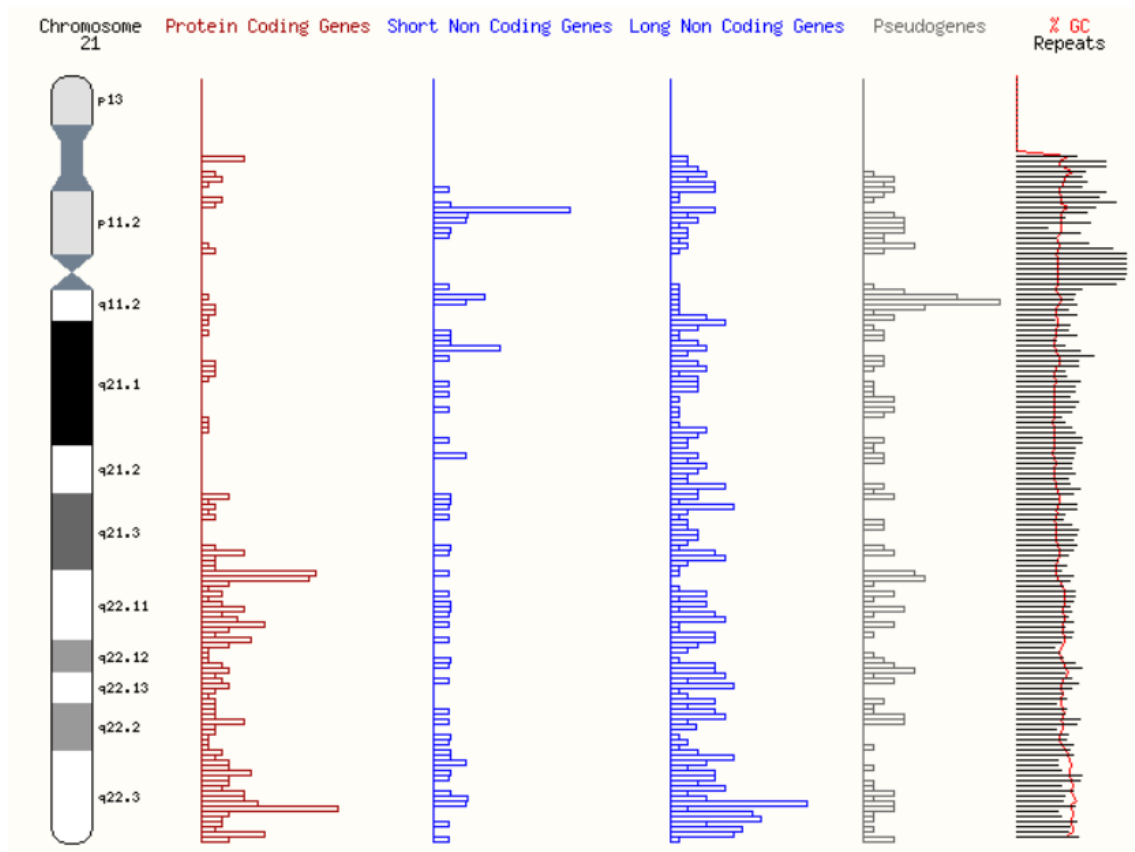
# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1. Introducción.

### 1.1. El síndrome de Down.

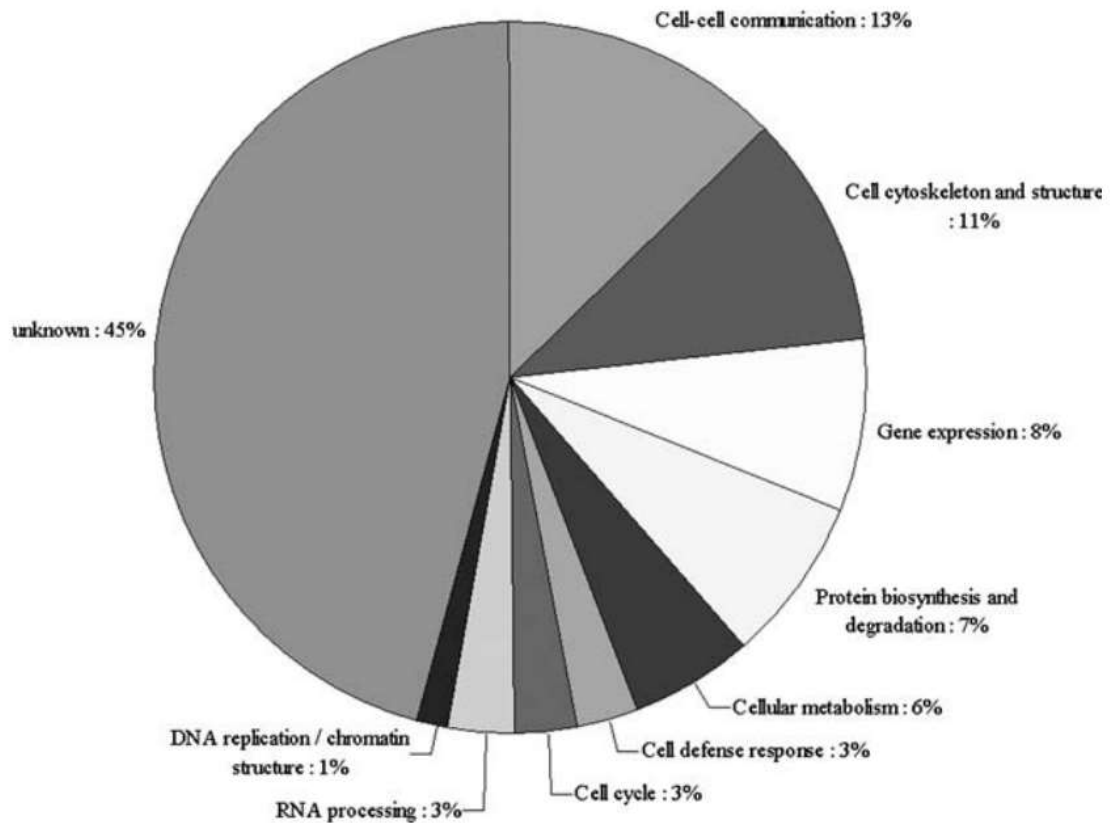
El síndrome de Down (SD) es la discapacidad intelectual de origen genético más frecuente. Se estima que, a nivel mundial, afecta a 1 de cada 1000 nacimientos (<https://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index1.html>) aunque la incidencia puede considerarse mayor debido a que, en algunos casos, constituye causa de aborto espontáneo y además presenta una alta incidencia de aborto terapéutico en casos de diagnóstico prenatal (Mansfield et al., 1999; Antonarakis et al., 2004; Natoli et al., 2012). Este síndrome fue descrito a nivel clínico en 1866 por John Langdon Haydon Down (Down, 1866) que caracterizó rasgos fenotípicos comunes a un amplio grupo de individuos que manifestaban discapacidad intelectual congénita. En 1959, Jérôme Lejeune, Martha Gautier y Raymond Turpin determinaron el origen genético del SD al identificar en el cariotipo de estos individuos la presencia de 47 cromosomas, debido a la trisomía del cromosoma 21 (Lejeune et al., 1959).

El cromosoma 21 humano (HSA21) tiene un tamaño aproximado de 46 millones de pares de bases, donde se estima la presencia de 236 genes codificantes, 424 genes no codificantes y 188 pseudogenes (**Fig. 1**) (<https://www.ensembl.org/index.html>). En su trabajo de 2003, Mao y colaboradores, identificaron niveles incrementados de expresión genética para genes del cromosoma 21 en muestras cerebrales fetales de individuos con trisomía del HSA21 (Mao et al., 2003). De forma interesante, este cromosoma presenta la particularidad de estar enriquecido en genes que codifican proteínas implicadas en la comunicación célula-célula, en la regulación génica, en la biosíntesis de proteínas y en proteínas del citoesqueleto (**Fig. 2**) (Kahlem, 2006; Antonarakis, 2017). Además, se han identificado diversos genes como RCAN1, APP, DSCAM, DYRK1A o BACE2 (Hattori et al., 2000; <https://www.ensembl.org/index.html>) que están asociados a procesos implicados en el neurodesarrollo y la función neuronal, por lo que su trisomía podría estar vinculada con los defectos cognitivos asociados al SD (Hattori et al., 2000; Kahlem, 2006; Asim et al., 2015).



**Figura 1. Distribución de los genes y pseudogenes en el HSA21.** Se muestra la distribución de genes que codifican proteínas (en rojo), así como de genes no codificantes (en azul) y pseudogenes (en gris). Tomado de <https://www.ensembl.org/>.

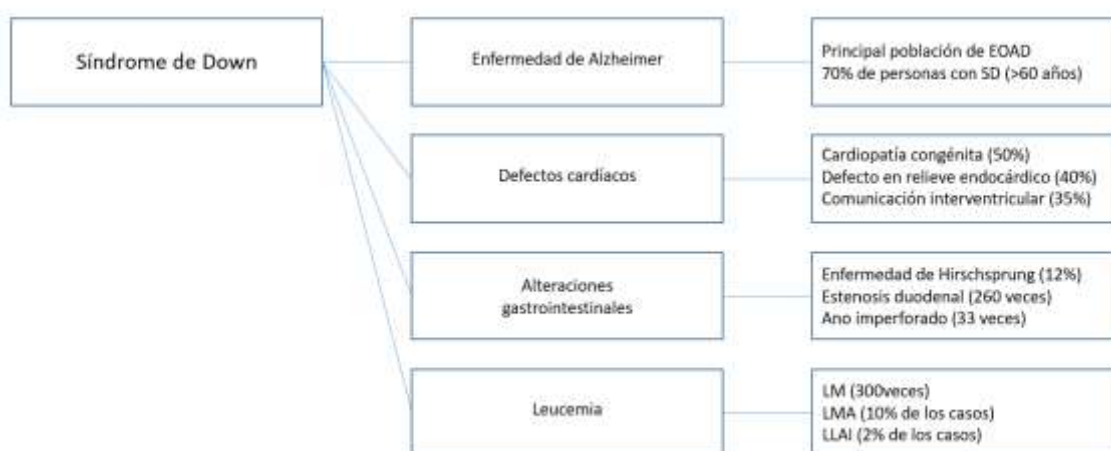
Aunque la principal causa del SD es la trisomía total del HSA21, existen casos de trisomía parcial que manifiestan en mayor o menor grado las características del SD (Korbel et al., 2009; Karmiloff-Smith et al., 2016). Algunas formas de trisomía parcial son la translocación robertsoniana del brazo largo del HSA21 (produciéndose, en general, la fusión con otro cromosoma acrocéntrico, como el cromosoma 14), o la formación del denominado isocromosoma (Atkins y Bartsocas, 1974; Antonarakis et al., 1990; Petersen et al., 1991; Kolgeci et al., 2012; Kollurage y Kudagammana, 2018). El isocromosoma consiste en una alteración que ocurre durante la disyunción meiótica en la línea germinal, e implica que el cromosoma 21 se divida de manera asimétrica, generando un cromosoma que contiene los dos brazos largos del HSA21. También existen casos de duplicaciones de fragmentos pequeños del HSA21. Todas estas alteraciones en la carga cromosómica pueden darse también durante el proceso de división mitótica, originando mosaicismo (Atkins y Bartsocas, 1974; Bandyopadhyay et al., 2003).



**Figura 2. Clasificación de los genes del HSA21 en base a su función.** Se muestra, en valores porcentuales, la contribución de los genes presentes en el cromosoma 21 en diferentes funciones celulares. Tomado de Kahlem, 2006.

El SD constituye factor de riesgo para diversas patologías severas y alteraciones congénitas como la enfermedad de Hirschsprung, la estenosis duodenal, la enfermedad de Alzheimer y diversas formas leucemia, de defectos cardíacos congénitos y de trastornos hematológicos (**Fig. 3**) (Laursen, 1976; Freeman et al., 1998; Antonarakis et al., 2004; Henry et al., 2007; Khan et al., 2011; Friedmacher y Puri, 2013; Benhaourech et al., 2016; Bergström et al., 2016). Además, los individuos con SD presentan una alta incidencia de otras manifestaciones clínicas como son: problemas auditivos, defectos en la visión, apnea y otros problemas respiratorios, alteraciones tiroideas e hipodontia (Merrick y Kaslowe, 2001; Schieve et al., 2009; Bull et al., 2011). La población con SD desarrolla leucemia con una frecuencia de 10 a 20 veces mayor que las personas sin este síndrome, siendo para los casos de leucemia megacariocítica (LM) hasta 300 veces más frecuente. Además, las personas con SD representan en torno al 10% de los casos de leucemia mieloide aguda (LMA) y el 2% de los casos de leucemia linfoblástica aguda en la infancia (LLAI) (Hasle et al., 2000; Khan et al., 2011). Existe además una alta

incidencia en la manifestación de defectos cardíacos. Alrededor del 50% de las personas nacidas con SD presentan cardiopatía congénita (la incidencia es variable dependiendo de la población de estudio). Las afecciones más frecuentes son el defecto en el relieve endocárdico, que aparece en un 40% de los casos, y consiste en una formación anómala de las paredes y válvulas que separan los ventrículos y las aurículas del corazón, así como la comunicación interventricular (observada en un 35% de los casos), en los que existe un orificio en el tabique interventricular que produce el tránsito entre ambos ventrículos (Freeman et al., 1998; Benhaourech et al., 2016; Bergström et al., 2016).



**Figura 3. Patologías asociadas al SD.** Se muestra un resumen de las principales patologías que son frecuentes en el SD (Asim et al., 2015; Antonarakis et al., 2004).

Por otra parte, entre las características fenotípicas asociadas a las personas con SD, destaca el déficit cognitivo, con defectos en aprendizaje y memoria, siendo una de las manifestaciones comunes en las personas con este síndrome (Carlesimo et al., 1997; Chapman y Hesketh, 2000; Antonarakis et al., 2004; Nelson et al., 2005). Además, estas personas presentan una alta incidencia de neuropatología de tipo Alzheimer tras superar los 30 años de edad (Wisniewski et al., 1985a; 1985b; Mann, 1988; Janicki y Dalton, 2000; Devenny et al., 2000; Krinsky-McHale et al., 2002; National Down Syndrome Society <https://www.ndss.org/>), y constituye el grupo de población más amplio que desarrolla demencia de tipo Alzheimer de inicio temprano (EOAD). Se estima que más del 70% de las personas con este síndrome padecerán demencia al superar la edad de 60

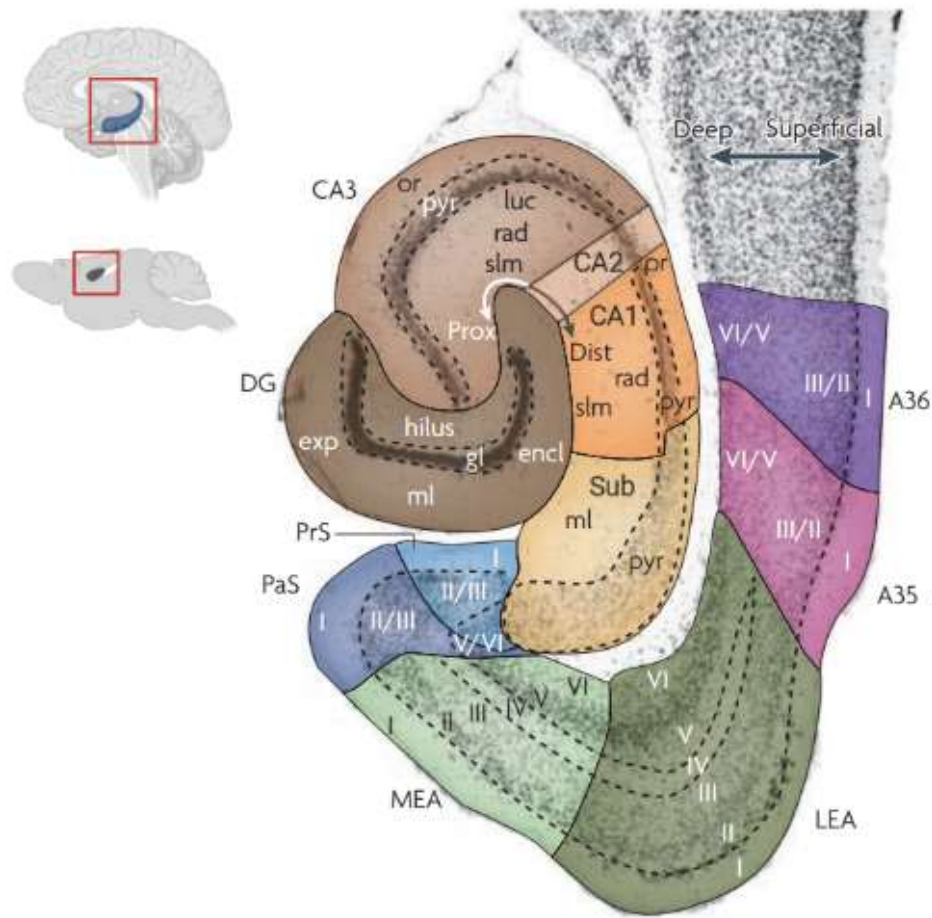
años (Lai y Williams 1989; Hartley et al., 2015; Ballard et al., 2016; McCarron et al., 2017).

Las personas con SD presentan un volumen cerebral reducido en las regiones frontal y temporal del cerebro, en el hipocampo y en el cerebelo (Kesslak et al 1994; Raz et al., 1995; Pinter et al., 2001a; 2001b; Mullins et al., 2013). A nivel celular, durante las primeras etapas de la gestación, no se aprecian diferencias en la densidad celular en el cerebro; no obstante, a partir de la semana 23 de gestación se han descrito una reducción en el grosor de la corteza y alteraciones de la estructura y la densidad neuronal (Golden y Hyman, 1994). Durante la gestación, así como en las primeras etapas postnatales (hasta los 2 meses y medio), las neuronas piramidales corticales de las personas con SD presentan una ramificación y longitud dendríticas similares a los individuos sin este síndrome, y una morfología y densidad de espinas semejantes (Takashima et al., 1981). No obstante, durante la infancia comienzan a observarse alteraciones a nivel de la morfología dendrítica, consistentes en una densidad de espinas reducida, así como la existencia de espinas de un tamaño aumentado (Marín-Padilla, 1976; Takashima et al., 1981). Ya en la etapa adulta, se ha descrito una profunda reducción de la arborización dendrítica en las neuronas piramidales. De forma adicional a estas alteraciones dendríticas, se ha observado también una reducción en el número de espinas de las regiones medial y distal de las dendritas apicales de neuronas piramidales del hipocampo y la corteza. Esta reducción es más acentuada en aquellos casos de personas con SD que además manifiestan demencia de tipo Alzheimer (Ferrer y Gullota, 1990; Benavides-Piccione et al., 2004). Dado que el hipocampo constituye una estructura fundamental en el procesamiento de la memoria declarativa y el aprendizaje (Eichenbaum, 2004), el estudio de la función sináptica del hipocampo es de particular interés en el contexto del SD (Pennington et al., 2003).

### *1.2. El hipocampo.*

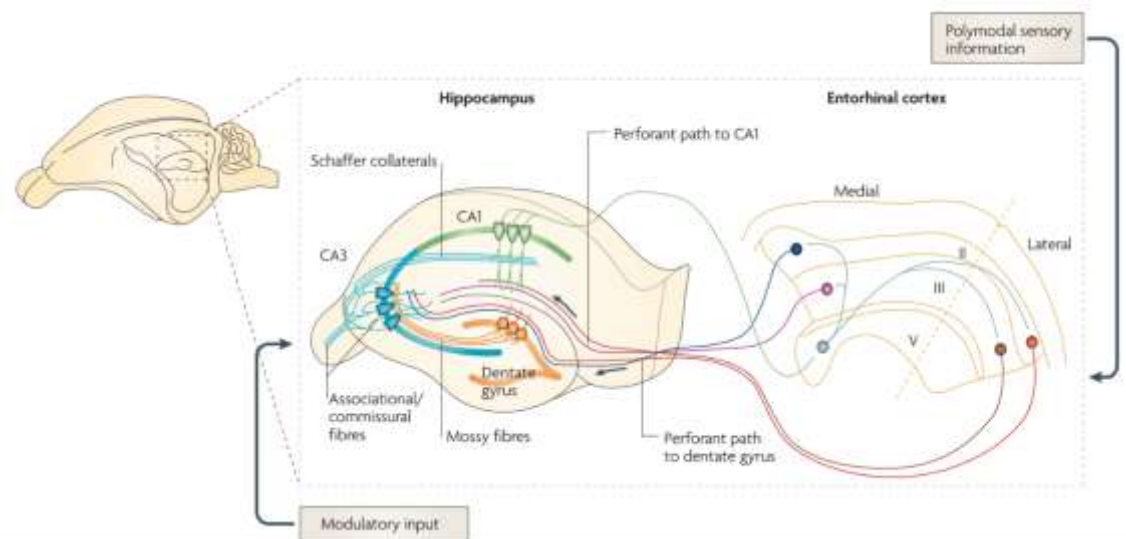
El hipocampo es una estructura cerebral localizada en la zona medial del lóbulo temporal en el humano, y que se ha vinculado a los procesos de aprendizaje y memoria (Scoville y Milner, 1957; Squire, 1992; Martin et al., 2000; Burgess et al., 2002; Eichenbaum, 2004; Hartley et al., 2007). La formación hipocampal se compone de giro dentado, *cornu ammonis* (CA), *subiculum*, *presubiculum*, *parasubiculum* y corteza entorrinal (**Fig. 4**). En la sección transversal a su eje se pueden apreciar las diferentes estructuras que forman parte del hipocampo y la clásica vía de señalización del

hipocampo conocida como “circuito trisináptico”. Si bien es la vía más estudiada, no es la única ruta de comunicación en esta estructura límbica (van Strien et al., 2009).



**Figura 4. Localización del hipocampo en el cerebro de roedores y humanos, y estructura observada en la sección transversal a su eje (en hipocampo de rata).** Los números romanos indican las capas corticales. DG, giro dentado; or, *stratum oriens*; pyr, *stratum pyramidale*; luc, *stratum lucidum*; rad, *stratum radiatum*; slm, *stratum lacunosum-moleculare*; exp, hoja expuesta del giro dentado; encl, hoja adyacente del giro dentado; gl, granule cell layer; ml, molecular layer; Sub, *subiculum*; PrS, *presubiculum*; PaS, *parasubiculum*; MEA, corteza entorrinal medial; LEA, corteza entorrinal lateral; A35 y A36, áreas de Brodmann 35 y 36. Modificado de van Strien et al., 2009.

El circuito trisináptico (**Fig. 5**) se define a partir de las eferencias corticales que provienen de la corteza entorrinal, y que proyectan sobre la región del giro dentado a través de la vía perforante. Desde el giro dentado, a través de la vía de las fibras musgosas, se establece conexión con la región CA3, la cual a su vez emite proyecciones hacia la región CA1, conocidas como colaterales de Schaffer. Finalmente, la región CA1 conecta de nuevo con la corteza entorrinal (Knierim, 2015).



**Figura 5. Circuito trisináptico del hipocampo.** Las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal medial y lateral proyectan sobre las regiones medial y externa, respectivamente, del árbol dendrítico de las células granulares del giro dentado, a través de la vía perforante. A su vez las células granulares se comunican a través de sus axones (fibras musgosas) con las dendritas apicales proximales de las neuronas piramidales de la región CA3. Las neuronas de la región CA3 emiten sus axones (las colaterales de Schaffer) sobre las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la región CA1, que a su vez comunican con la corteza entorrinal. Las neuronas de la región CA3 también se comunican con las regiones CA3 y CA1 contralaterales a través de las fibras comisurales. Tomado de Neves et al., 2008.

### 1.2.1. Estructuras del hipocampo.

#### 1.2.1.1. Giro dentado.

El giro dentado está compuesto principalmente por neuronas granulares que reciben aferencias, en su mayoría, de las células estrelladas de la capa II de la corteza entorrinal, a través de la vía perforante del hipocampo. Estas neuronas, a su vez, emiten eferencias en el *hilus*, donde se encuentran las células musgosas, y sobre la región *stratum lucidum* de la CA3 (Amaral et al., 2007). Esta conexión forma parte, como ya se ha mencionado, de lo que se conoce como circuito trisináptico del hipocampo. Las células granulares están sometidas a regulación retrograda a través de las células musgosas y las interneuronas del *hilus*, que las estimulan e inhiben respectivamente (Wiera y Mozrzymas, 2015). El giro dentado alberga además uno de los dos nichos neurogénicos del cerebro en el adulto (Andersen et al., 2007).



### 1.2.1.2. *Cornu ammonis*.

El *cornu ammonis* constituye el complejo celular que conecta el giro dentado con la corteza entorrinal en la progresión del circuito trisináptico. Se subdivide en 4 regiones: CA4, CA3, CA2 y CA1.

Las regiones CA3, CA2 y CA1 se estructuran en capas. El *stratum pyramidale* comprende la capa somática de neuronas piramidales (que es el principal tipo neuronal de estas regiones del hipocampo), y presenta mayor compactación en la región CA1. Adyacente a la capa somática y en la zona basal de las neuronas piramidales se encuentra el *stratum oriens*, que abarca las dendritas basales de estas neuronas, y donde también se encuentran algunas interneuronas. En la región apical se diferencian dos capas: el *stratum radiatum*, adyacente a la capa somática (en CA2 y CA1), y el *stratum lacunosum-moleculare* en la región más distal de la zona apical de las neuronas piramidales. Por otra parte, en la región CA3 se observa una capa más en la región apical, localizada entre el *stratum pyramidale* y el *stratum radiatum*, que se denomina *stratum lucidum*. Esta capa define la extensión de la región CA3 y corresponde a la zona de tránsito y comunicación de la vía de las fibras musgosas en CA3. En la sección perpendicular al eje del hipocampo, el límite de esta capa corresponde al giro de las fibras musgosas y la continuación de su comunicación de forma paralela al eje del hipocampo (Andersen et al., 2007).

Por último, la región CA4 se conoce comúnmente como *hilus* y corresponde a la capa polimórfica del giro dentado situada en la región apical del haz de células granulares (Andersen et al., 2007). Contiene interneuronas y las células musgosas, y es la vía para las eferencias y aferencias de las células granulares del giro dentado con CA3 (Wiera y Mozrzymas, 2015).

### 1.2.2. *Plasticidad en el hipocampo*.

La plasticidad sináptica hace referencia a los procesos de cambio de eficacia y/o morfología que ocurren a nivel de las sinapsis (Hebb, 1949; Pascual-Leone et al., 2005). Como ya se ha introducido previamente, el hipocampo constituye una estructura fundamental para la memoria y el aprendizaje (Burgess et al., 2002). Si bien aún se desconocen los mecanismos que subyacen a estos procesos, numerosos estudios apoyan la relación entre memoria/aprendizaje y plasticidad sináptica (Carew et al., 1981; Kandel y Schwartz, 1982; Martin et al., 2000; Kasai et al., 2010; Takeuchi et al., 2014).

### 1.2.2.1 Formas de plasticidad en el hipocampo.

En el hipocampo coexisten diversas formas de plasticidad y, dada la versatilidad de las sinapsis de esta área cerebral, ha sido, y sigue siendo, objeto de multitud de estudios con el propósito de establecer las bases moleculares de la memoria y el aprendizaje.

Existen dos aspectos principales en base a los cuales se pueden clasificar las principales formas de plasticidad: la eficiencia sináptica y la duración de la modificación sináptica. Respecto a la eficiencia sináptica, se definen como depresión sináptica aquellos casos en los que el remodelado sináptico implica una disminución de la eficiencia. Por otro lado, los casos en los que se produce un incremento de la eficacia sináptica se definen como potenciación (Bear y Malenka, 1994; Citri y Malenka, 2008; David y Barret, 2014). Ambas formas de modificación de la función sináptica pueden ser transitorias (a corto plazo) o de larga duración/permanentes (a largo plazo) (Bear y Malenka, 1994; Citri y Malenka, 2008; David y Barret, 2014).

Una de las formas de potenciación a largo plazo (LTP, *long term potentiation*) más ampliamente estudiadas, es la LTP dependiente de receptores de NMDA (NMDAR) (Bliss y Collingridge, 1993). Esta forma de plasticidad puede ser inducida mediante uno o varios estímulos eléctricos de alta frecuencia (HFS) (Bliss y Collingridge, 1993; Lüscher y Malenka, 2012; Park et al., 2014; Volianskis et al., 2015). De forma general se considera que la NMDAR-LTP es inducida por la activación de los NMDAR por glutamato en un estado despolarizado del terminal postsináptico que desbloquea dichos canales y permite su apertura y la entrada de  $Ca^{++}$  al interior celular (Bear y Malenka, 1994; Teyler et al., 1995). Esta forma de plasticidad es dependiente de la entrada de  $Ca^{++}$  extracelular, de la participación de los reservorios intracelulares de  $Ca^{++}$  (Bliss y Collingridge, 1993; Teyler et al., 1995; Volianskis et al., 2015), y requiere la traducción local de proteínas para su mantenimiento (Frey et al., 1988; Teyler et al., 1995; Ostroff et al 2002; Lüscher y Malenka, 2012). Esta forma de plasticidad provoca modificaciones de la sinapsis como el incremento de la permeabilidad de los receptores AMPA (AMPA) y su reclutamiento al terminal postsináptico (Heynen et al., 2000; Makino y Malinow, 2009; Lüscher y Malenka, 2012; Morita et al., 2014). La NMDAR-LTP también está asociada a cambios estructurales, como el agrandamiento de la espina y la aparición de nuevas espinas adyacentes a la estimulada (Maletic-Savatic, 1999; Matsuzaki et al., 2004;

Kasai et al., 2010; Lüscher y Malenka, 2012), y puede modificar la actividad de espinas cercanas a la estimulada (Harvey y Svoboda, 2007). Diversos estudios realizados en ratones muestran un déficit en diversas formas de memoria y aprendizaje asociado a la pérdida o disminución de función de los NMDAR (Morris et al., 1986; Davis et al., 1992; Sakimura et al., 1995; Tsien et al., 1996; Shimizu et al., 2000). De manera contraria, el incremento de la expresión de estos receptores se ha vinculado a un incremento de la HFS-LTP y la mejora de algunas formas de aprendizaje y memoria (Tang et al., 1999; Tang et al. 2001). En humanos se ha observado algo similar: el tratamiento con antagonistas de los receptores NMDA produce un defecto en memoria y aprendizaje como consecuencia de dicho bloqueo (Rockstroh et al., 1996; Malhotra et al., 1996; Newcomer et al., 1999; Honey et al., 2005). No obstante, no se puede asumir que estas alteraciones en los procesos de aprendizaje y memoria se deban de manera exclusiva a una alteración de la LTP, ya que los NMDAR participan también en otros procesos de modificación de la eficiencia sináptica (Hunt y Castillo, 2012).

Otra forma de plasticidad descrita en relación a los NMDAR, es la NMDAR-LTD. Desde las primeras evidencias de que la estimulación de los NMDAR con el agonista que les da nombre, el NMDA (N-metil-D-aspartato), podía inducir depresión de la respuesta sináptica (Collingridge et al., 1983), diversos estudios han mostrado la contribución de estos receptores a esta forma de plasticidad. Se sugiere que la diferencia fundamental que permite que estos receptores participen en dos formas de plasticidad opuestas, radica en las características cinéticas de la conducción del  $Ca^{++}$  ante los diferentes estímulos de inducción (Dudek y Bear, 1992; Lüscher y Malenka, 2012; Volianskis et al., 2015). Se ha descrito que la NMDAR-LTD puede ser inducida mediante estímulo eléctrico de baja frecuencia (LFS) (Dudek y Bear, 1992; Mulkey y Malenka, 1992; Kemp et al., 2000) y es dependiente de la entrada de  $Ca^{++}$  en el terminal postsináptico (Mulkey y Malenka, 1992) y de la actividad de fosfatasa (Mulkey et al., 1993; Henson et al., 2017). En esta forma de plasticidad, la entrada de  $Ca^{++}$  a través de NMDARs promueve la endocitosis de los AMPAR (Beattie et al., 2000) y la disminución de su actividad (Lee et al., 1998), lo que provoca la reducción de la eficacia sináptica (Collingridge et al., 2004; 2010). El mantenimiento de este estado de depresión sináptica es dependiente de la traducción de proteínas (Manahan-Vaughan et al., 2000). Esta forma de plasticidad se ha vinculado a la retracción y eliminación de espinas dendríticas (Zhou et al., 2004; Henson et al., 2017), y hay indicios de su participación en procesos de memoria, como son la consolidación de

la memoria condicionada por miedo y de la memoria espacial (Ge et al., 2010; Liu et al., 2014).

En relación a la LTP, resulta también interesante el papel de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR). Se ha descrito que estos receptores participan en algunas formas de LTP observadas en el hipocampo (Bashir et al., 1993a; Bortolotto et al., 1999; Raymond et al., 2000; Anwyl, 2009; O’Riordan et al., 2014; Wang et al., 2016a). Estas formas de plasticidad han sido poco caracterizadas, y son muy limitadas las regiones donde se ha observado una forma de LTP puramente dependiente de mGluR (Wang et al., 2016a). No obstante, se definen dos formas de mGluR-LTP según la vía de transmisión potenciada. Así, se distingue entre mGluR-LTP de transmisión mediada por AMPARs (mGluR-LTP(A)) y mGluR-LTP de transmisión mediada por NMDARs (mGluR-LTP(N)) (Anwyl, 2009). La contribución o relevancia de los mGluRs en ambas formas de plasticidad no es igual, ya que, si bien son necesarios para la mGluR-LTP(N), no son indispensable en el caso de la mGluR-LTP(A). Por otra parte, es preciso considerar que las características del protocolo de inducción de LTP puede condicionar la contribución de los mGluRs (Anwyl, 2009; Wang et al., 2016a).

La mGluR-LTP es dependiente de traducción de proteínas (Raymond et al., 2000; Wang et al., 2016a) y, en la mayoría de las sinapsis, su inducción depende de un incremento de  $Ca^{++}$  intracelular, aunque las vías de incorporación del  $Ca^{++}$  difieren según el tipo de mGluR-LTP. Este incremento puede estar mediado por NMDARs, canales de  $Ca^{++}$  tipo L, canales TRP, AMPARs con permeabilidad al  $Ca^{++}$ , o provenir de reservorios intracelulares (Anwyl, 2009).

En el hipocampo, los mGluRs participan en otra forma de plasticidad, la mGluR-LTD (Bashir et al., 1993b; Huber et al., 2001). Esta forma de plasticidad puede ser inducida mediante la aplicación de agonistas de los mGluRs del grupo I (Palmer et al., 1997; Fitzjohn et al., 1999; Huber et al., 2000; 2001; 2002) o mediante estímulo de baja frecuencia de pulso pareado (Kemp y Bashir, 1999; Huber et al., 2000; 2002). La participación del  $Ca^{++}$  en esta forma de plasticidad, así como su relación con la traducción local de proteínas, depende de diversos factores y además varía con el desarrollo (Nosyreva y Huber, 2005; Kumar y Foster, 2007; Holbro et al., 2009; Collingridge et al., 2010; Chakroborty et al., 2012). Los mecanismos que subyacen a esta forma de plasticidad se detallarán con mayor profundidad más adelante. En cuanto a la relación de los mGluR con los procesos cognitivos, se ha descrito que la carencia de mGluR5 está

asociada a defectos en aprendizaje (Sanderson et al., 2016), aunque, dado que estos receptores participan en otras formas de plasticidad, su contribución al aprendizaje podría no depender de la mGluR-LTD. No obstante, se ha descrito que la mGluR-LTD contribuye a la codificación de la disposición espacial de objetos nuevos (Lüscher y Huber 2010).

Además de lo anteriormente expuesto, existen otros receptores que participan en plasticidad en el hipocampo, como son:

- los receptores muscarínicos, que se han asociado a diversas formas de LTD (Volk et al., 2007; Dickinson et al., 2009; Zhu et al., 2013), aunque también contribuyen a la LTP (Takkala y Woodin, 2013; Dennis et al., 2016).

- el sistema endocannabinoide, que contribuye a la LTP excitatoria del hipocampo induciendo LTD heterosináptica en el sistema GABAérgico (Yasuda et al., 2008; Chevaleyre y Castillo, 2003) y que también participa en la mGluR-LTD (Rouach y Nicoll, 2003).

- los receptores de kainato, que participan de una forma de LTP independiente de NMDARs en las sinapsis de las fibras musgosas (Collingridge et al., 2004).

- los sistemas GABAérgicos, que modulan la mGluR-LTD (Oliet et al., 1997) y participan en otras formas de plasticidad, tanto de tipo LTD (Zhu et al., 2013), como LTP (Chevaleyre y Castillo, 2003; Yasuda et al., 2008).

### *1.3. Ratones modelo de SD.*

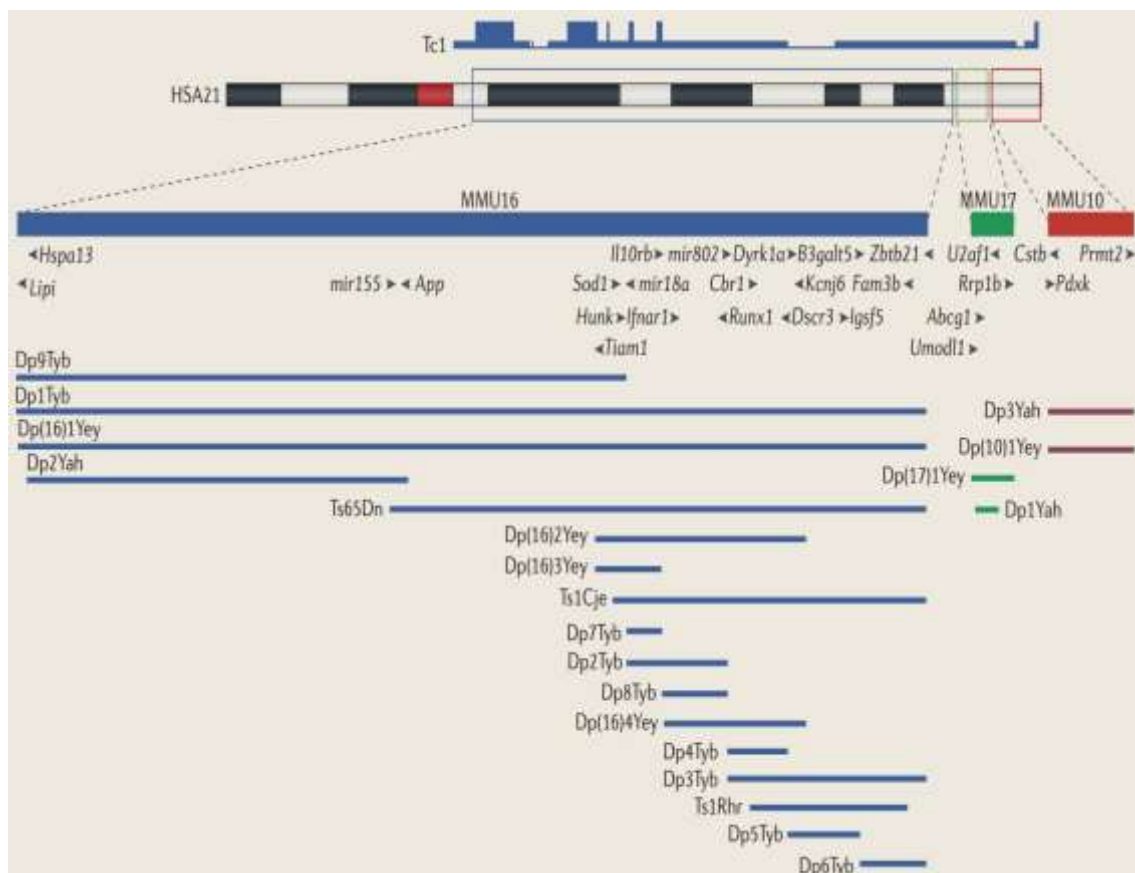
Se han desarrollado diversos modelos murinos que emulan en mayor o menor medida la trisomía del cromosoma 21 humano. Los genes ortólogos a los del HSA21 se distribuyen en tres cromosomas en el ratón: cromosomas 10, 16 y 17 (<https://www.ensembl.org/index.html>; Antonarakis et al., 2004). El cromosoma murino 16 (MMU16) contiene la mayoría de esos genes ortólogos, por lo que un buen número de ratones modelo de SD son trisómicos parciales para el MMU16 (**Fig. 6**). Entre ellos destaca el ratón Ts65Dn (Davisson et al., 1990), siendo el más ampliamente usado. No obstante, este modelo presenta a nivel genómico una región triplicada del cromosoma 17 que no es ortóloga al HSA21, lo que implica la presencia adicional de 60 genes en trisomía no relacionados con el SD (Duchon et al., 2011). Existen otros modelos, como el Ts1Cje

(Sago et al., 1998), que no presentan este problema, aunque el fragmento en trisomía contiene un número menor de genes.

El ratón Ts1Cje (**Fig. 6**), modelo utilizado en esta Tesis Doctoral, presenta trisomía parcial del segmento cromosómico del MMU16 que abarca desde el gen SOD1 al Mx1 (94 genes en trisomía). Dicha región presenta una alta homología con la región 21q22.1-22.3 humana (Sago et al., 1998). La traslocación del Mmu16 con el Mmu12 hace que este ratón presente algunos genes del cromosoma 12 murino en monosomía (Duchon et al., 2011)

### 1.3.1. Alteraciones de la plasticidad en los ratones Ts1Cje y Ts65Dn.

El estudio de la plasticidad en los ratones modelo de SD (**Tabla 1**) ha sido una de las principales herramientas de investigación para esclarecer los mecanismos que puedan subyacer a las alteraciones en aprendizaje y memoria en el contexto del SD.



**Figura 6. Modelos murinos de SD.** Se muestra el HSA21 y las regiones ortólogas en los correspondientes cromosomas murinos 16,17 y 10 (bandas azul, verde y roja, respectivamente). Aparecen anotados los genes que flanquean las regiones en trisomía en los diferentes modelos.

En la parte superior se representa el modelo transcromosómico Tc1, mostrando las duplicaciones (bandas) y deleciones (líneas estrechas). Aparecen también reflejados los modelos Ts1Cje y Ts65Dn, obtenidos por translocación del MMU16, y diversos modelos de duplicaciones (Dp). Para información adicional de los diversos modelos murinos de SD ver Antonarakis et al., 2017 y Herault et al., 2017. Tomado de Antonarakis et al., 2017.

El modelo más ampliamente estudiado, el Ts65Dn, muestra alteraciones en diversos *tests* de comportamiento asociados a memoria y aprendizaje espacial (Reeves et al 1995; Sago et al., 2000; Das y Reeves, 2011), así como en diversas formas de plasticidad del hipocampo. En este ratón se ha descrito una LTP disminuida en la región CA1 al aplicar diversos protocolos de inducción eléctrica (Siarey et al., 1997; Costa y Grybko, 2005; Scott-Mckean et al., 2018), así como en la región del giro dentado (Kleschevnikov et al., 2004). También se ha observado una NMDAR-LTD incrementada en la región CA1 (Siarey et al., 1999; Scott-McKean y Costa, 2011) aunque la mGluR-LTD no parece estar afectada (en ratones de 6-8 meses) (**Tabla 1**) (Scott-McKean y Costa, 2011).

Por otro lado, los ratones modelo Ts1Cje muestran una disminución en el comportamiento de exploración, así como defectos en aprendizaje espacial, en la persistencia de la memoria a largo plazo y en el reconocimiento de objetos (Sago et al., 1998; 2000; Andrade-Talavera et al., 2015). Estudios de plasticidad, mediante registro electrofisiológico de LTD y LTP inducidas por estímulos eléctricos, han demostrado la existencia de una LTP disminuida y una LTD dependiente de NMDAR aumentada en la región CA1 del hipocampo (Siarey et al., 2005). Además, el ratón Ts1Cje presenta un déficit en la inducción de LTP en la región del giro dentado, que se restaura con pretratamiento de picrotoxina, un inhibidor de los receptores de ácido  $\gamma$ -aminobutírico A (GABA-A) (Belichenko et al., 2007). En relación a las alteraciones en la plasticidad, nuestro grupo en colaboración con el laboratorio dirigido por el Dr. Antonio Rodríguez Moreno (Universidad Pablo Olavide, Sevilla) demostró la ausencia de una forma de potenciación a corto plazo, la facilitación por pulso pareado (PPF) en el hipocampo de este ratón modelo, así como una disminución en la transmisión sináptica basal en ratones de edad p21-p30 (Andrade-Talavera et al., 2015). En este sentido, resulta peculiar que, para el ratón adulto, Siarey y colaboradores no observaron alteración en la transmisión basal sináptica (**Tabla1**) (Siarey et al., 2005).

En el modelo Ts1Cje, trabajos previos desarrollados por nuestro grupo de investigación han demostrado la existencia de una alteración en el proceso de traducción local sináptica asociado a la hiperfosforilación de mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) que implica la hiperactivación de esta vía de señalización (Troca-Marín et al., 2011).

Posteriormente, otros grupos de investigación también han observado hiperfosforilación de mTOR en muestras *postmortem* de tejido cerebral de personas con SD (Iyer et al., 2014; Perluigi et al., 2014). La traducción local es un proceso clave para la formación y la remodelación de las sinapsis, siendo la ruta de señalización mTOR una de las principales vías de regulación de la traducción local, como se discutirá más adelante. La alteración de la vía mTOR observada en el hipocampo del modelo Ts1Cje parece deberse a un mayor nivel de BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) y/o pro-BDNF en las regiones CA1 y giro dentado, que produciría un estado de “saturación” de los receptores TrkB (Troca-Marín et al., 2011; 2014). En relación con esta hiperactivación de mTOR, el modelo Ts1Cje presenta un déficit en la LTP dependiente de BDNF en el hipocampo, que se restaura al tratar con rapamicina, un fármaco inhibidor específico de mTOR (Andrade-Talavera et al., 2015).

### 1.3.2. Alteraciones de la morfología sináptica en los ratones Ts1Cje y Ts65Dn.

En cuanto a la morfología neuronal del hipocampo del ratón Ts1Cje adulto, se ha descrito la existencia de una menor densidad de espinas dendríticas, así como un incremento en la proporción de espinas de mayor tamaño en la región del giro dentado (Belichenko et al., 2007). Esta alteración morfológica de las espinas en el giro dentado es un aspecto común en los modelos Ts1Cje y Ts65Dn (Belichenko et al., 2004; 2007). Además, en los ratones Ts65Dn, también hay un mayor número de espinas de gran tamaño en la región CA1 (**Tabla 2**) (Belichenko et al., 2004).

## 1.4. LTD dependiente de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR-LTD).

### 1.4.1. Papel fisiológico de la mGluR-LTD.

La LTD es uno de los paradigmas principales de plasticidad en el hipocampo, y consiste en una disminución de la eficacia sináptica, así como una remodelación del terminal post-sináptico que puede suponer, en última instancia, la retracción y eliminación de espinas dendríticas (Nägerl et al., 2004; Zhou et al., 2004; Ramiro-Cortés e Israely, 2013). En las neuronas glutamatérgicas del hipocampo es de particular interés



la LTD dependiente de la activación de receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I (mGluR1 y mGluR5), que puede ser inducida experimentalmente mediante la aplicación del agonista (S)-3,5-Dihidroxifenilglicina (DHPG) (Palmer et al., 1997; Fitzjohn et al., 1999; Huber et al., 2000; 2001). Esta forma de plasticidad participa en la regulación de la morfología de las espinas dendríticas y está asociada al proceso de retracción y eliminación de estas (Ramiro-Cortés e Israely, 2013; Oh et al., 2013), lo cual podría estar relacionado con el proceso de “poda” sináptica observado durante el neurodesarrollo (Yuste, 2010; Piochon et al., 2016).

**Tabla 1. Transmisión basal y plasticidad sináptica en el hipocampo en los ratones modelos de SD Ts65Dn y Ts1Cje.**

	<b>Ts65Dn</b>	<b>Age of mice</b>	<b>REFERENCE</b>
Basal CA1 transmission	glutamatergic: normal	2 months	Siarey et al., 1999
	glutamatergic: normal	6-8 months	Scott-McKean and Costa, 2011
	GABAergic: normal	P8-10 and P19-21	Mitra et al., 2012
	GABAergic: increased (in s. radiatum and s. pyramidale, but not in s. oriens; not due to increased GABA release)	P14-16	Mitra et al., 2012
	GABAergic: increased (not due to increased GABA release; increased GABA <sub>A</sub> $\beta$ /GIRK currents in stratum lacunosum moleculare)	2-3 weeks	Best et al., 2007 ; 2012
	GABAergic: increased (higher number of GABAergic neurons)	2-3 weeks	Chakrabarti et al., 2010
CA1 Paired Pulse Facilitation (PPF)	normal (IPSC)	P14-16	Mitra et al., 2012
	normal (EPSP)	2 months	Siarey et al., 1999
	normal (EPSP)	6-9 months	Scott-McKean et al., 2018
CA1 LTP	decreased (HFS protocol)	2 months	Siarey et al., 1997
	decreased (HFS protocol)	9 months	Siarey et al., 1997
	decreased (4xHFS)	6-9 months	Scott-McKean et al., 2018
	normal (HFS protocol) or decreased (theta-burst protocol; restored with picrotoxin)	4-6 months	Costa and Grybko, 2005 Martínez-Cué et al., 2013
CA1 LTD	increased (LFS protocol)	2 months	Siarey et al., 1999
	increased (NMDAR dependent)	6-8 months	Scott-McKean and Costa, 2011
	normal (mGluR dependent)	6-8 months	Scott-McKean and Costa, 2011
Basal DG transmission	glutamatergic: normal	3-4 months	Kleschevnikov et al., 2004
	NMDAR: normal	3-4 months	Kleschevnikov et al., 2004
	GABAergic: increased (increased GABA release)	3-4 months	Kleschevnikov et al., 2004; 2012
DG (NMDAR dependent)	decreased (restored with picrotoxin)	3-4 months	Kleschevnikov et al., 2004
	<b>Ts1Cje</b>	<b>Age of mice</b>	<b>REFERENCE</b>
Basal excitatory CA1 transmission	glutamatergic: normal	2-3 months	Siarey et al., 2005
	glutamatergic: decreased (restored with rapamycin)	P21-30	Andrade-Talavera et al., 2015
CA1 PPF	absent (EPSP) (restored with rapamycin)	P21-30	Andrade-Talavera et al., 2015
CA1 LTP	decreased (HFS protocol)	2-3 months	Siarey et al., 2005
	absent (BDNF-LTP) (restored with rapamycin)	P21-30	Andrade-Talavera et al., 2015
CA1 LTD	Increased	2-3 months	Siarey et al., 2005
DG LTP	decreased (restored with picrotoxin)	3-4 month	Belichenko et al., 2007

**Tabla 2. Características morfológicas de las sinapsis en el hipocampo de los ratones Ts65Dn y Ts1Cje.**

	<b>Ts65Dn</b>	<b>Age of mice</b>	<b>REFERENCE</b>
CA1 spine density	normal	P21	Belichenko et al., 2004
	increased (CA1 basal dendrites)	6 months	Belichenko et al., 2004
	decreased (CA1 synaptic density)	16-23 months	Kurt et al., 2004
DG spine density	decreased	P21	Belichenko et al., 2004
	decreased	6 months	Belichenko et al., 2004
	decreased (DG synaptic density)	16-23 months	Kurt et al., 2004
CA1 spine morphology	enlarged spines and short necks	P21, 3 months and 6 months	Belichenko et al., 2004
DG spine morphology	enlarged spines and short necks	P21, 3 months and 6 months	Belichenko et al., 2004
	<b>Ts1Cje</b>	<b>Age of mice</b>	<b>REFERENCE</b>
CA1 spine density	Normal	9-10 months	Belichenko et al., 2007
DG spine density	Decreased	9-10 months	Belichenko et al., 2007
CA1 spine morphology	-	-	-
DG spine morphology	enlarged spines and short necks	9-10 months	Belichenko et al., 2007

#### 1.4.2. Mecanismos de la mGluR-LTD

Los mecanismos moleculares que subyacen a esta forma de plasticidad son variables durante el desarrollo (**Tabla 3**). Así, en estudios llevados a cabo en ratas de diferentes rangos de edad se ha observado no solo un cambio en los mecanismos involucrados en la mGluR-LTD, sino también una variación en la contribución relativa de los terminales pre- y postsinápticos a esta forma de plasticidad.

En animales en estadio postnatal temprano (P8-P18) se ha observado una mGluR-LTD independiente de traducción de proteínas y en la cual no se observan cambios en los niveles de AMPAR en la superficie de la sinapsis (Nosyreva y Huber, 2005). En este rango de edad, algunos autores observan una participación del terminal presináptico en la inducción de esta forma de plasticidad, cuya contribución tiende a reducirse con el desarrollo (Fitzjohn et al., 2001; Nosyreva y Huber, 2005). No obstante, en un trabajo realizado por Zhang y colaboradores, la mGluR-LTD se define como una actividad puramente postsináptica (Zhang et al., 2006).

En animales en la etapa juvenil (P21-P35) la mGluR-LTD es dependiente de traducción de proteínas, y es en este estadio donde parece haber una mayor contribución del terminal postsináptico (Huber et al., 2000). Además, existe una reducción de los AMPAR en superficie debido a su internalización, que está mediada por proteínas sintetizadas *de novo* mediante traducción local en la sinapsis (Nosyreva y Huber, 2005).

Finalmente, en otro trabajo realizado con ratas adultas jóvenes (5-8 meses) y ratas adultas envejecidas (22-26 meses) también se observó una variación en esta forma de plasticidad que, en primera instancia, quedaría reflejada por un incremento de la mGluR-LTD en los individuos envejecidos (Kumar y Foster, 2007). A nivel sináptico, se observó que en las ratas envejecidas (de manera similar a lo que sucede en la etapa postnatal temprana) adquiere relevancia la contribución del terminal presináptico a la LTD (Kumar y Foster, 2007).

Otro aspecto diferencial se refiere a la mayor contribución de los receptores mGluR1 o mGluR5, dependiendo del rango de edad estudiado. En ratas envejecidas, la importancia de los receptores mGluR1 en la mGluR-LTD es mayor que en los individuos adultos jóvenes (Kumar y Foster 2007). De manera contraria, en los animales jóvenes, la inducción de la mGluR-LTD está principalmente asociada a la actividad de los mGluR5 (Fitzjohn et al., 1999). Por otra parte, aunque se ha observado que el tratamiento con DHPG también conlleva un incremento en la función asociada a NMDARs (Fitzjohn et al., 1996), en animales jóvenes no se ha observado participación ni de NMDARs ni de canales de  $Ca^{++}$  voltaje-dependientes de tipo L en esta forma de plasticidad. Sin embargo, en las ratas envejecidas, si bien no son imprescindibles, ambos contribuyen a la mGluR-LTD (Kumar y Foster, 2007).

En resumen (**Tabla 3**), los diversos trabajos antes mencionados permiten constatar la variabilidad de la mGluR-LTD durante el desarrollo, tanto en la contribución de los terminales pre- y postsinápticos, como en los mecanismos moleculares implicados, y su dependencia o no de síntesis de proteínas. Por tanto, resulta complejo definir mecanismos generales partícipes en la LTD inducida por los mGluR1/5 (mGluR Gp I).

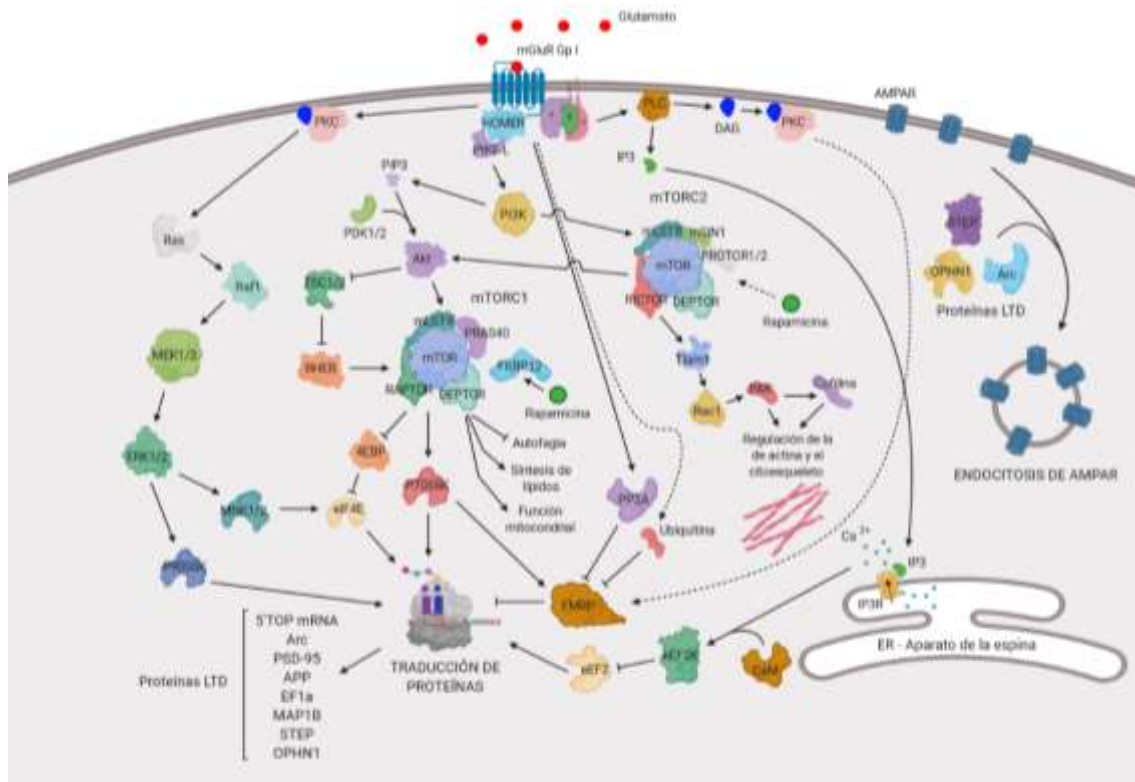
**Tabla 3. Mecanismos implicados en la mGluR-LTD.**

Age	P8 – P15	P12 - P18	P14 – P19	P14 - P42	P21 - P28	P21 - P35	5 – 8 months	22 – 26 months
Protein translation	Unnecessary					Necessary	Necessary	Necessary
PPF	Increased (larger increase compared to P21-P35)	Increased	Unaffected		Unaffected	Increased	Increased	Increased (larger increase compared to 5-8 months)
Surface levels of AMPAR	Normal				Decreased	Decreased		
Endocannabinoid activation	Unnecessary			Unnecessary (participation in acute depression)				
Calcium dependency		Independent					Independent of NMDAR and L-type Ca <sup>2+</sup> channels activity	Dependent of NMDAR and L-type Ca <sup>2+</sup> channels activity
LTD expression	Presynaptic	Presynaptic	Postsynaptic		Postsynaptic	Mainly postsynaptic	Mainly postsynaptic	Post- and Presynaptic
Reference	Nosyreva and Huber, 2005	Fitzjohn et al., 2001	Zhang et al., 2006	Rouach and Nicoll, 2003	Huang and Hsu, 2006; Huang et al., 2004	Nosyreva and Huber, 2005; Huber et al., 2000	Kumar and Foster, 2007	Kumar and Foster, 2007

Se ha descrito que los mGluR Gp I están asociados a proteínas G de la familia G<sub>q</sub> (Kleppisch et al., 2001). Cuando se estimulan estos receptores, se produce la activación de la fosfolipasa C (PLC), que genera inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2). El DAG media la activación de la proteína quinasa C (PKC) que está implicada en la regulación de diversos procesos asociados a esta forma de plasticidad, como se describirá más adelante (Saugstad e Ingram, 2008). Por su parte, el IP3 induce un incremento en los niveles de Ca<sup>++</sup> intracelular procedente de los reservorios intracelulares de calcio. Si bien existe cierta controversia en cuanto a la contribución del Ca<sup>++</sup> en esta forma de plasticidad (Otani y Connor, 1998; Fitzjohn et al., 2001; Kumar y Foster, 2007; Ireland y Abraham, 2008; Holbro et al., 2009; Kasten et al., 2012; Chakroborty et al., 2012), es posible que su participación sea dependiente de la edad y esté asociada a cambios producidos durante el desarrollo (Kumar y Foster, 2007). En este sentido, es preciso considerar diversos trabajos en los que se ha descrito que las espinas dendríticas de mayor tamaño presentan retículo endoplasmático asociado que forma el denominado “aparato de la espina” (Spacek, 1985; Edwards, 1995; Spacek y Harris 1997; Holbro et al., 2009). El aparato de la espina es una especialización del retículo endoplasmático de estructura laminar, compuesto de sáculos aplanados que actúan como reservorios intracelulares de Ca<sup>++</sup> y participan en la traducción local de proteínas (Spacek, 1985; Pierce et al., 2000; 2001; Yuste, 2010; Bell et al., 2019). Este tipo de espinas son las únicas susceptibles de sufrir mGluR-LTD en el hipocampo (Holbro et al., 2009). En este sentido, se ha descrito también que la activación de los mGluR provoca la retracción solo de las espinas de gran tamaño y que éste es un proceso dependiente de los receptores de IP3 (IP3R) (Oh et al., 2013). Todo esto sugiere que los reservorios intracelulares de Ca<sup>++</sup> tienen un papel fundamental en esta forma de plasticidad.

#### *1.4.3. Participación de la síntesis de proteínas en la mGluR-LTD.*

Dada la relevancia del proceso de traducción local en la mGluR-LTD en animales jóvenes (**Tabla 3**), ha sido de gran interés la caracterización de las rutas de señalización implicadas en esta forma de plasticidad (**Fig. 7**).



**Figura 7. Rutas implicadas en la mGluR-LTD dependiente de la traducción local de proteínas.** Tras la activación de los mGluRs se activa la PLC, que genera DAG e IP3 (Saugstad e Ingram, 2008). El DAG provoca la activación de PKC, proteína necesaria para el reclutamiento de FMRP a la sinapsis tras la activación de los mGluR (Antar et al., 2004). Además, la PKC puede participar en la activación de la vía MEK/ERK, que también contribuye a la regulación de la traducción local mediada por MNK1/2 y P90S6K (Roberson et al, 1999; Gallagher et al., 2004; Bhakar et al., 2012; Sanderson et al., 2016). El IP3, por su parte, contribuye a la activación de receptores IP3 de los reservorios intracelulares de calcio, provocando la movilización de  $Ca^{++}$  al terminal postsináptico (Gladding et al, 2009; Collingridge et al., 2010; Oh et al., 2013). Este incremento del nivel de  $Ca^{++}$  activa a la calmodulina (CaM), que participa en la regulación de la traducción de proteínas modulando a eEF2 (*eukariotic Elongation Factor 2*) (Collingridge et al., 2010). No obstante, la contribución del  $Ca^{++}$  en esta forma de plasticidad es controvertida, y variable durante el desarrollo (Fitzjohn et al., 2001; Kumar y Foster, 2007; Gladding et al, 2009; Holbro et al., 2009; Chakroborty et al., 2012). Por otra parte, la activación de los mGluRs induce la activación de PI3K, mediada por el complejo HOMER/PIKE-L (Ronesi y Huber, 2008; Bhakar et al., 2012). La PI3K participa en la activación de los complejos 1 y 2 de mTOR (mTORC1 y mTORC2). La vía mTORC1 está vinculada a la regulación de la traducción de proteínas mediada por P70S6K y eIF4E (Bhakar et al., 2012; Lipton y Sahin, 2014). mTORC1 también participa en la regulación de los procesos de autofagia, la síntesis de lípidos y la función mitocondrial (Lipton y Sahin, 2014; Bartolomé et al., 2017; Bordi et al., 2019). Por otro lado, mTORC2, participa en la regulación de la actina y el citoesqueleto, y regula la actividad de mTORC1 (Nakahata y Yasuda, 2018). En la regulación de la traducción local también tiene especial relevancia FMRP, que es fosforilada por P70S6K (activada a su vez por mTORC1) y desfosforilada por PP2A, que es activada a su vez por los mGluRs (Hou et al., 2006; Narayanan et al., 2007). La activación de los mGluR induce, además, una rápida ubiquitinación y degradación de FMRP, lo cual favorece la traducción de los ARNm asociados a esta proteína represora (Hou et al., 2006). Las proteínas sintetizadas tras la activación de los mGluR participan en diversos procesos como son la propia regulación de la maquinaria de traducción, y la endocitosis de los AMPAR, lo que contribuye en última instancia a la reducción de la eficacia sináptica (Nadif Kasri et al., 2011; Nakahata y Yasuda, 2018). Creado con BioRender.com.

La estimulación de los mGluR Gp I se ha relacionado con la regulación de la actividad de la proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) (Huber et al., 2002; Antar et al., 2004; 2005; Hou et al., 2006; Westmark y Malter, 2007; Narayanan et al., 2007; 2008; Park et al., 2008). FMRP es un represor de la traducción de mensajeros dendríticos (Laggerbauer et al., 2001), cuyo silenciamiento está vinculado al síndrome del X Frágil (Pieretti et al., 1991; Sutcliffe et al., 1992), otra de las causas más frecuentes de discapacidad intelectual.

En su forma fosforilada, FMRP interacciona con estructuras secundarias de determinados ARNm reprimiendo la traducción de dichos mensajeros (Li et al., 2001; Schaeffer et al., 2001; Ceman et al., 2003). Cuando se estimulan los mGluR Gp I, se produce la activación de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), que desfosforila a FMRP y permite la traducción de los ARNm asociados (Narayanan et al., 2007). Además, tras la activación de los mGluR Gp I, se produce una rápida ubiquitinación de FMRP y su degradación por el proteasoma, lo cual podría favorecer un incremento del tiempo para la traducción de los ARNm diana de FMRP (Hou et al., 2006). También se ha descrito que la actividad de FMRP en la sinapsis depende de la activación de la PKC y de la liberación de Ca<sup>++</sup> desde los reservorios intracelulares, inducida por la PLC (Antar et al 2004).

Otra vía regulada por la actividad de los mGluR Gp I es la ruta MEK (*MAPK/ERK kinase*)/ERK (*extracellular signal-regulated protein kinase*) (Gallagher et al., 2004; Sanderson et al., 2016). La vía MEK/ERK participa en la regulación de la traducción local de proteínas en la sinapsis mediante la activación de P90S6K (*ribosomal S6 kinase*) y de MNK (*MAP kinase-interacting kinase*). P90S6K actúa sobre la subunidad S6 del ribosoma, y MNK regula a eIF4E (*eukariotic translation Initiation Factor 4E*) siendo ambos procesos necesarios para la iniciación de la traducción de determinados ARNms (Klann y Dever, 2004; Bhakar et al., 2012).

#### 1.4.3.1. Ruta de señalización mTOR en la mGluR-LTD.

Existen evidencias de la participación de mTOR en la mGluR-LTD que, generalmente, se han asociado al papel de mTORC1 en la regulación de la traducción de proteínas sinápticas (Hou y Klann, 2004; Ronesi y Huber, 2008; Narayanan et al 2007; 2008; O'Riordan et al., 2014; Zhu et al., 2017; Zhu et al., 2018).

mTOR es una quinasa de serina/treonina implicada en el control de la homeostasis mediante la regulación de los procesos de transcripción y de traducción de proteínas, la



autofagia y el mantenimiento y biogénesis de orgánulos (Lipton y Sahin, 2014). mTOR actúa formando parte de dos complejos, mTORC1 y mTORC2 (**Fig. 7**). Ambos complejos presentan componentes comunes, como son el propio mTOR, mLST8 (*mammalian lethal with sec13 protein*) y DEPTOR (*inhibitory DEP domain containing mTOR-interacting protein*). Por otra parte, son componentes exclusivos del complejo mTORC1, RAPTOR (*Regulator-Associated Protein of mTOR*) y PRAS40 (*Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa*). Otra proteína relevante es FKBP12 (*12 kDa FK506 Binding Protein*), que se asocia a mTORC1 e influye en su actividad (Hoeffler et al., 2008; Lipton y Sahin, 2014). FKBP12, además, es responsable de la acción inhibitoria de la rapamicina sobre mTORC1, ya que el complejo rapamicina-FKBP12 interacciona con mTOR, inhibiéndolo (Brown et al., 1994; Lipton y Sahin, 2014; Li et al., 2014).

Por su parte el complejo mTORC2 contiene de manera exclusiva a RICTOR (*Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR*), a mSIN1 (*mammalian stress-activated MAP kinase-interacting protein 1*) y a PROTOR 1 y 2 (*proteins observed with RICTOR 1 y 2*) (Lipton y Sahin, 2014). Si bien se ha considerado de forma general que la rapamicina inhibe únicamente mTORC1, existen estudios que demuestran que la rapamicina puede actuar inhibiendo tanto a mTORC1 como a mTORC2, dependiendo de la concentración del fármaco y la duración del tratamiento, así como de los niveles de las FKBP12 (Li et al., 2014; Lipton y Sahin, 2014; Schreiber et al., 2015; Zhu et al., 2018). Así, se ha sugerido que la rapamicina a altas concentraciones se uniría directamente a mTOR en el sitio de unión del complejo FKBP12-rapamicina, afectando a mTORC1 y mTORC2 (Lipton y Sahin, 2014).

Está descrito que los mGluR5, a través del complejo formado con la proteína Homer y la GTPasa PIKE-L, activan a la proteína PI3K (fosfatidilinositol-3 quinasa), que produce PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato) a partir de PIP2 (**Fig. 7**). El PIP3 junto a PDK1/2 (*Phosphoinositide-Dependent Kinase*) provoca la movilización de la quinasa Akt (*protein kinase B*) a la membrana y su consecuente activación. Akt activa a mTORC1 mediante fosforilación directa o bien mediante la inhibición de los complejos TSC1 y TSC2 (*Tumor Supresor Complex 1 y 2*). La supresión de los complejos TSC1 y TSC2 permite actuar a RHEB (*Ras Homolog Enriched in Brain*), que es un activador de mTORC1 (Bhakar et al., 2012).

Una de las principales funciones de mTORC1 es la regulación de la traducción de determinados mensajeros, mediada por P70S6K (*ribosomal protein S6 kinase*) y 4EBP1 (*eIF4E Binding Protein 1*). Cuando es activada por mTORC1, P70S6K produce la fosforilación de la subunidad S6 del ribosoma, lo que facilita la unión de los ARNm y ARNt a la subunidad 40S. Por otro lado, la fosforilación de la proteína inhibitoria 4EBP1 por mTORC1 produce su liberación del eIF4E (*eukaryotic Initiation Factor 4E*), factor necesario para la iniciación de la traducción (Hou y Klann, 2004; Waung y Huber, 2009; Bhakar et al., 2012). mTORC1 también participa en la regulación de la traducción local sináptica mediada por FMRP. Así, una vez activada por mTORC1, P70S6K1 fosforila a FMRP, lo que reprime la acción de PP2A (Narayanan et al., 2007; 2008).

Además de su participación en la traducción de proteínas en la sinapsis, mTORC1 regula otros procesos como la autofagia, que ha sido asociada al proceso de poda sináptica durante el desarrollo (Tang et al., 2014; Bordi et al., 2019).

Por otra parte, mTORC2 participa en la regulación del citoesqueleto. En neuronas se ha observado que RICTOR, que como ya se ha indicado, forma parte de mTORC2, regula Tiam1. Esta proteína controla la actividad de Rac1, un regulador del citoesqueleto, y de PAK y cofilina, que son proteínas moduladoras de la polimerización de actina. La ausencia de mTORC2 provoca defectos en la memoria a largo plazo y afecta a la morfología de las espinas dendríticas, lo que apoya su relevancia en la plasticidad sináptica y remodelación de las sinapsis (Costa-Mattioli y Monteggia, 2013). Recientemente se ha descrito que mTORC2 es necesario para la mGluR-LTD mientras que mTORC1, si bien podría participar en esta forma de plasticidad, no es indispensable, en ratones adultos de 3-6 meses de edad (Zhu et al., 2018).

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO**

## **2. Hipótesis y objetivos.**

Considerando la relevancia de la plasticidad sináptica en los procesos de memoria y el aprendizaje, el estudio de los mecanismos que subyacen a este fenómeno neuronal resulta de gran interés en el contexto del SD. En este sentido, trabajos previos realizados por diversos laboratorios, incluido el nuestro, han descrito alteraciones en vías de señalización relevantes para la plasticidad sináptica en el ratón modelo de SD Ts1Cje (Tabla 1), correlacionando con déficits de memoria y plasticidad. Los trabajos anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de investigación evidencian un papel importante de la vía mTOR, que está implicada en la regulación de la traducción local, plasticidad y mantenimiento de la sinapsis. Como ya se ha indicado, la vía mTOR está hiperactiva en el hipocampo de los ratones Ts1Cje (Troca-Marín et al., 2011), lo que conlleva la desaparición de BDNF-LTP en la región CA1 (Andrade-Talavera et al., 2015), una forma de plasticidad dependiente de mTOR. La vía de señalización mTOR también participa en la mGluR-LTD en esa misma región del hipocampo (Hou y Klann; Zhu et al., 2018). La mGluR-LTD participa en la regulación de la morfología de las espinas dendríticas (Ramiro-Cortés e Israely, 2013; Oh et al., 2013), y se ha asociado a procesos de memoria como el reconocimiento de la disposición espacial de objetos y el reconocimiento de objetos nuevos (Lüscher y Huber 2010). La alteración de la morfología de las espinas dendríticas en SD, así como en modelos murinos, incluido el ratón Ts1Cje (Tabla 2), está bien establecida. Por otra parte, resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran un déficit en la memoria espacial de reconocimiento de objetos nuevos (Dra. Itziar Benito, datos no publicados).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, la hipótesis de partida de esta Tesis Doctoral es que la mGluR-LTD de la región CA1 del hipocampo estaría afectada en el ratón Ts1Cje, lo que podría conllevar alteraciones morfológicas de las espinas dendríticas. La rapamicina, un inhibidor específico de mTOR podría tener un efecto terapéutico en ambos aspectos. La caracterización proteómica de las sinapsis de hipocampo en este modelo de SD permitiría la identificación de alteraciones moleculares compatibles con dichas afectaciones, lo que podría resultar en la propuesta de nuevas dianas terapéuticas. Por tanto, los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral son:

1. Caracterizar a nivel proteómico las sinapsis de hipocampo del ratón Ts1Cje y determinar el efecto de la rapamicina sobre el proteoma sináptico en este ratón modelo.
2. Analizar la mGluR-LTD de la región CA1 del hipocampo del ratón Ts1Cje y, en caso de presentar una desregulación, determinar el posible efecto restaurador de la rapamicina.
3. Analizar la densidad y morfología de espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo del ratón Ts1Cje y, en el caso de estar alterada, evaluar el posible efecto terapéutico del tratamiento con rapamicina.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3. Materiales y métodos.

#### 3.1. Animales.

En este trabajo se utilizaron los ratones modelo de SD Ts1Cje (Sago et al., 1998). Estos ratones fueron adquiridos a Jackson Laboratories (USA) y se mantuvieron mediante un sistema de cruzamiento de ratones macho Ts1Cje y hembras híbridas B6C3F1 (adquiridas a Charles River), tal y como se recomienda por el proveedor, con objeto de mejorar la viabilidad de la estirpe.

Para los experimentos se emplearon ratones silvestres (WT) y Ts1Cje hermanos de camada, con edades comprendidas entre P21 y P30 (día post-natal 21 y 30) o adultos (>2 meses). El cuidado, tratamiento y sacrificio de los ratones se ajustó a lo determinado por las leyes nacionales e internacionales de protección animal. Todos los procedimientos llevados a cabo fueron previamente aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla y por la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía (número de referencia 24/05/2016/097).

Para el genotipado de los ratones mediante PCR, se utilizó ADN aislado a partir de biopsias de cola. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l, en tubos de plástico que contenían: 2,5  $\mu$ l de buffer comercial 10x (Biotools), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 0,4  $\mu$ M de cada uno de los oligonucleótidos indicados abajo y 0,04 unidades de Taq polimerasa (Biotools). Los oligonucleótidos empleados fueron los siguientes:

Neo-fw: 5'- CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC

Neo-rev: 5'- AGG TGA GAT GAC AGA GAT C

Tcrd-fw: 5'- CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG

Tcrd-rev: 5'- GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT

Neo-fw y Neo-rev amplifican una banda de 280 pares de bases (pb) perteneciente al gen de resistencia a neomicina, que solo está presente en los ratones trisómicos. Tcrd-fw y Tcrd-rv amplifican una banda de 200 pb, tanto en los ratones silvestres como en los trisómicos, por lo que sirve como control positivo. El programa de PCR para el genotipado constó de un paso de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 s, *annealing* a 58°C durante 45 s y



polimerización a 72°C durante 45 s. Los productos obtenidos en las reacciones de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Los animales adultos fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Los animales P18-P30, utilizados para experimentos de electrofisiología y tinción de Golgi, fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de tribromoetanol (Sigma, Ref. T48402) al 2% en solución salina (NaCl 0,9%), a una dosis de 300 mg/kg, y decapitados posteriormente.

### 3.2. Fármacos y tratamientos.

El DHPG ((S)-3,5-Dihidroxifenilglicina; Sigma-Aldrich, Ref. D-3689) se preparó en agua a una concentración 10 mM y se conservó a -20°C hasta uso. Este stock 10 mM se diluyó en ACSF hasta una concentración final de 100 µM para los tratamientos de rodajas de hipocampo.

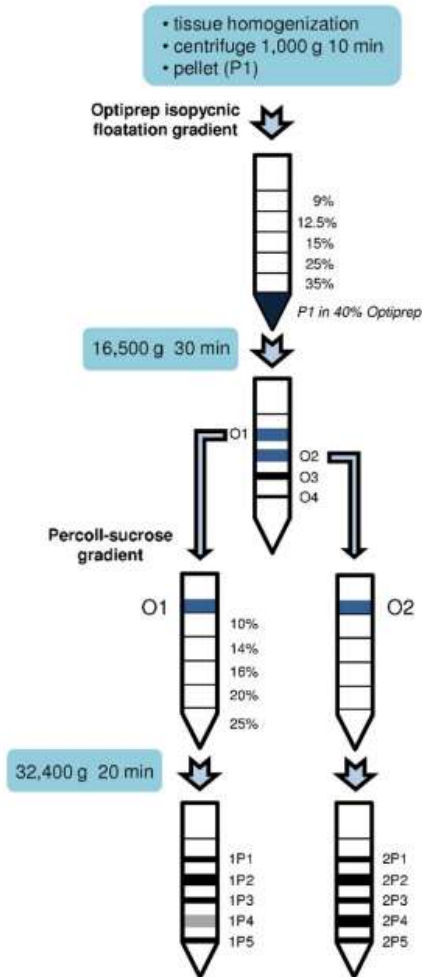
Para la preparación del inyectable de rapamicina destinado al tratamiento de hembras gestantes, la rapamicina (Selleckchem, Ref.S1039) fue disuelta en suero salino (NaCl 0,9%) con etanol al 1%, polietilenglicol 400 al 0,25% y Tween® 80 al 0,25% (Tsai et al., 2013), a una concentración final de 0,1 mg/ml. La rapamicina se administró a una dosis de 1 mg/kg mediante inyección intraperitoneal única a las hembras gestantes entre los días E15 y E17 (días de gestación 15 y 17).

Para el inyectable de rapamicina destinado al tratamiento de ratones adultos, la rapamicina fue disuelta en suero salino (NaCl 0,9%) con etanol al 4%, Tween®80 al 5% y polietilenglicol 400 al 5% (Kwon et al., 2003), a una concentración final de 1mg/ml. Se administró a una dosis de 10 mg/kg mediante inyección intraperitoneal durante 5 días (una inyección al día) antes de llevar a cabo el aislamiento de sinaptoneurosomas de hipocampo.

### 3.3. Aislamiento de sinaptoneurosomas (SNs) de hipocampo.

Para aislar SNs de hipocampo de ratones silvestres y Ts1Cje, se siguió el protocolo publicado previamente por nuestro laboratorio (Troca-Marín et al., 2010; **Fig. 8**). Para ello se extrajo el cerebro de ratones adultos (ratones de 2-4 meses, 3 ratones por grupo experimental) y se procedió al aislamiento de los hipocampos en PBS (“*phosphate buffered saline*”; PanReac, Ref. A9177) a 4°C. Los hipocampos fueron recolectados en HS (“*Hepes solution*”). Esta solución consiste en: Hepes 10 mM (Sigma, Ref. H4034),

pH7,4; sacarosa 320 mM (Sigma, Ref. S0389); MgSO<sub>4</sub> 1 mM (Sigma, Ref. M7506); leupeptina 10 μM (Sigma, Ref. L2884); aprotinina 2 μg/ml (Sigma, Ref. A1153) y pepstatina 1 μM (Sigma, Ref. P5318). Seguidamente, los hipocampos se homogenizaron usando un homogenizador Dounce de teflón, a 650 revoluciones por minuto (rpm) y 4°C.



**Figura 8. Protocolo de aislamiento de SNs.** Se muestra un esquema de los principales pasos del protocolo de aislamiento de SNs utilizado en este trabajo. Tomado de Troca-Marín et al., 2010.

El homogenado se centrifugó a 1.000g durante 10 min a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en HS y se realizó un nuevo ciclo de homogenización a 200 rpm y 4°C. La suspensión resultante se diluyó en OWS (Optiprep™ *working solution*) en una proporción 1:10. El OWS consiste en: Optiprep™ (Sigma, Ref. D1556) 50%, Hepes 10 mM, sacarosa 65 mM, Mg SO<sub>4</sub> 1 mM, leupeptina 10 μM, aprotinina 2 μg/ml y pepstatina 1 μM. Esta suspensión diluida en OWS constituyó la capa inferior de un gradiente de Optiprep™ con variaciones de concentración de Optiprep™ del 9 al 35% (Optiprep™

9%, 12,5%, 15%, 25%, 35%) preparada en OGB (Optiprep™ *gradient buffer*). El OGB consiste en: Hepes 10 mM, sacarosa 300 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, leupeptina 10 μM, aprotinina 2 μg/ml y pepstatina 1 μM. Este gradiente se centrifugó a 16.500 g durante 30 min a 4°C, se recolectó la fracción O1 (capa de material localizado entre las fases de Optiprep™ 9% y 12,5%) y se realizó un lavado de este material con OGB, centrifugando a 20.000 g durante 10 min a 4°C. El pellet obtenido fue resuspendido en HS y rehomogeneizado con un homogenizador Dounce de vidrio, manualmente. La suspensión obtenida se añadió como última capa de un gradiente de Percoll® con variaciones de concentración de Percoll® del 10 al 25% (Percoll® (Sigma Ref. P1644) 10%, 14%, 16%, 20%, 25% en HS) y se centrifugó a 32.400 g durante 20 min a 4°C. A continuación, se recolectó la fracción 1P4 (capa de material localizado entre las fases de Percoll® 16% y 20%), que es la fracción enriquecida en SNs. Esta fracción 1P4 fue resuspendida en HS y sometida a otra centrifugación a 20.000 g durante 10 min a 4°C. Seguidamente, el pellet obtenido se lavó dos veces con SB (“*synaptoneurosome buffer*”, consistente en Hepes 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,2 mM (Sigma Ref. 223506); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 mM (Sigma Ref. 71505); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM (Sigma Ref. P5379); NaHCO<sub>3</sub> 4 mM (Sigma Ref. S5761); NaCl 80 mM (Sigma Ref. S7653); leupeptina 10 μM, aprotinina 2 μg/ml y pepstatina 1 μM), centrifugándose a 20.000 g durante 10 min a 4°C. Los pellets obtenidos se conservaron a -80°C hasta su análisis proteómico.

#### 3.4. Análisis proteómico mediante iTRAQ (*Isobaric tags for relative and absolute quantitation*).

La extracción de proteínas de las muestras, el marcado mediante iTRAQ y el análisis de espectrometría de masas en tándem fue realizado por el Servicio de Proteómica del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS).

Las proteínas de las muestras de SNs se extrajeron mediante una solución de lisis compuesta por dodecilsulfato sódico (SDS), inhibidores de proteasas (Sigma, Ref. P8340), inhibidores de fosfatasas (phosphatase inhibitor cocktail I y cocktail II, Sigma, Ref. P2850 y P5726, respectivamente) y Benzonase® (Sigma, Ref. E8263). Tras 1 hora de incubación, las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm en una microcentrífuga durante 15 min a 4°C, y a continuación se determinó la cantidad de proteína presente en el sobrenadante. El marcaje mediante iTRAQ (AB ScieX, Ref. 4390811) se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante, omitiendo el proceso de precipitación de

proteínas para conservar aquellas presentes de manera minoritaria en las muestras. Para cada condición experimental se marcaron 50 µg de proteínas por duplicado (8-plex). Los datos obtenidos por espectrometría de masas fueron analizados mediante el software Proteome Discover 1.4 (ThermoFisher Scientific) ajustando que el valor *False Discovery Rate* (FDR) fuese menor de 0,01, tanto para las proteínas como para los péptidos identificados.

### 3.5. Análisis de los datos proteómicos mediante PANTHER (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*) e IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*).

Para verificar que las preparaciones de SNs utilizadas en los experimentos de iTRAQ estaban enriquecidas en proteínas sinápticas, se llevó a cabo un análisis utilizando la herramienta informática PANTHER, versión 16.0 (Mi et al., 2021). Concretamente, se llevó a cabo un test de sobre-representación, seleccionando el genomio completo de *Mus musculus* (21.988 proteínas) y el conjunto de datos anotados “*PANTHER GO-Slim Cellular Component*”, aplicando una corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Esta herramienta está disponible “*on line*”: <http://www.pantherdb.org>.

Los datos cuantitativos obtenidos mediante el software Proteome Discover se analizaron mediante la herramienta informática IPA (Qiagen, Fall release September 2019), con objeto de determinar las vías de señalización afectadas en las diferentes condiciones experimentales analizadas. El umbral para la selección de proteínas que se consideraban con expresión alterada se estableció en base a las variaciones observadas en los replicados de las muestras silvestres sin tratamiento, ajustándolo a los límites del rango que contenía más del 80% de los datos. Aplicando dicho criterio, se consideró que las proteínas con una expresión superior a 1,2 veces el valor de referencia o inferior a 0,8 estaban afectadas.

Como base de datos de referencia para el análisis mediante IPA se empleó la “*Ingenuity Knowledge Base*” (marcando la opción “solo genes”). Solo se consideraron las moléculas e interacciones observadas previamente de manera experimental en tejidos y/o células (astrocitos o neuronas) del sistema nervioso del ratón, la rata o el humano.

El software IPA genera una lista de rutas canónicas afectadas de manera significativa basado en dos parámetros, el *p-value* y el *z-score*. El *p-value*, calculado con el test exacto de Fisher con cola a la derecha, es una medida de la probabilidad de que

una vía concreta esté enriquecida en el grupo de proteínas desreguladas debido al azar. Para aumentar la exigencia del análisis, se consideraron solo aquellas vías con un *p-value* inferior o igual a 0,005.

Por otra parte, la herramienta IPA predice si las rutas identificadas como alteradas estarían activadas o inhibidas en base a los cambios en los niveles de expresión de las proteínas desreguladas. Estas predicciones se establecen mediante el algoritmo *Z-score* de IPA. Un valor positivo del *Z-score* indica que el análisis predice una activación de la vía correspondiente y un valor negativo para este parámetro indica inhibición. Las rutas canónicas que no son seleccionables para el análisis de actividad en la versión usada de IPA se indican como N/A.

### 3.6. Preparación de extractos de proteína, electroforesis y Western blot.

Se realizaron *Western blots* (WB) a partir de rodajas de hipocampo (P21-P30) o de hipocampo total de ratones adultos.

En el caso de ratones P21-P30, se extrajo el cerebro, que se depositó en líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) con sustitución parcial de sodio por sacarosa (ACSFs) (véase apartado 3.7 para su composición), con suministro de carbógeno (CO<sub>2</sub> 5%; O<sub>2</sub> Resto; H<sub>2</sub>O <5ppm), y seguidamente se procedió a la obtención de secciones horizontales de 350 µm mediante un vibratomo (Vibratome 3000, Sectioning System). Las rodajas se depositaron en una cámara de incubación durante 30 min a 33-34°C en ACSF con suministro de carbógeno. Tras este periodo de incubación, las rodajas permanecieron durante al menos 2 horas en ACSF a temperatura ambiente (RT; 22-25°C). Seguidamente un grupo de rodajas fueron tratadas con DHPG 100µM durante 5 min y otras permanecieron el mismo tiempo sin recibir tratamiento. Ambos grupos de rodajas se congelaron tras 60 min. desde el inicio del tratamiento.

En el caso de ratones adultos, se extrajo el cerebro y se aislaron los hipocampos, que se sometieron a congelación rápida con hielo seco. A continuación, se añadió tampón de lisis a las muestras y se homogeneizaron a 200 rpm durante 1 min mediante un homogenizador Dounce de teflón. El tampón de lisis consistió en: Tris 50 mM (pH 7,4); Triton® X-100 0,5%; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; SDS 0,6%; Phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma Ref. P5726) 1%; Phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma Ref. P0044) 1%; Protease inhibitor cocktail (Sigma Ref. P8340) 1%. Seguidamente, se centrifugó el

homogenado a 14,500 rpm durante 15 min a RT, y se recolectó el sobrenadante, al que se añadió Laemmli Buffer (SDS 2%; sacarosa 42,5 g/l; azul bromofenol 0,85 g/l; Tris 12,75 mM pH 6,8; EDTA 5,1 mM pH 7,4; ditioneitol (DTT) 150 mM). Las muestras se incubaron a 100°C durante 10 min para su desnaturalización. Seguidamente, se llevó a cabo la electroforesis de las muestras en geles de poliacrilamida comerciales (SDS-PAGE; MiniPROTEAN® TGX Stain-Free™ de BioRad, Ref. 4568086) y la transferencia a membranas de PVDF (Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack de BioRad, Ref. 1704156) mediante el sistema Trans-Blot® Turbo™ (BioRad).

Una vez transferidas las proteínas a las membranas, estas se lavaron con TBS-T (NaCl 8g/l; Tris 50 mM pH 7,5 y Tween® 20 al 0,1%) y se incubaron durante 1 h a RT en una solución de leche desnatada en polvo al 1% en TBS-T, con objeto de bloquear y prevenir uniones inespecíficas de los anticuerpos. Una vez transcurrido el tiempo de bloqueo, se llevó a cabo la incubación durante 20-24 h a 4-8°C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TBS-T con albumina de suero bovino (BSA) al 2%. Se usaron los anticuerpos primarios anti-LC3B (Cell Signaling; Ref. #2775, RRID: AB\_915950), anti-TOM20 (Novus; Ref. NBP1-81556, RRID: AB\_11003249) y anti-RICTOR (Cell Signaling; Ref. #2114, RRID: AB\_2179963) a las concentraciones correspondientes (1:1000 para LC3B y TOM20, y 1:1500 para RICTOR). Tras la incubación con el anticuerpo primario se realizaron lavados con TBS-T y se prosiguió con la incubación de la membrana con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (anti-rabbit HRP, PROMEGA, Ref.W401B) diluido en solución de bloqueo a la concentración correspondiente (1:5000 para LC3B y para RICTOR, y 1:2000 para TOM20). Mediante el sustrato WesternBright Quantum HRP Substrate (Advansta, Ref. K-12042-D-10) se reveló el marcaje de las membranas, y se midió la quimioluminiscencia resultante mediante el sistema ChemiDoc XRS (BioRad).

Los datos obtenidos mediante la cuantificación de las señales quimioluminiscentes se normalizaron por la cantidad de proteína total presente en el gel antes de su transferencia a membrana, detectables gracias el sistema de formación de compuestos trihalo característico de los geles TGX (BioRad). De este modo, las señales correspondientes se cuantificaron mediante el sistema ChemiDoc XRS.

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos mediante WB se aplicó el test t-Student comparando los genotipos entre sí, o los tratamientos con sus respectivos controles.

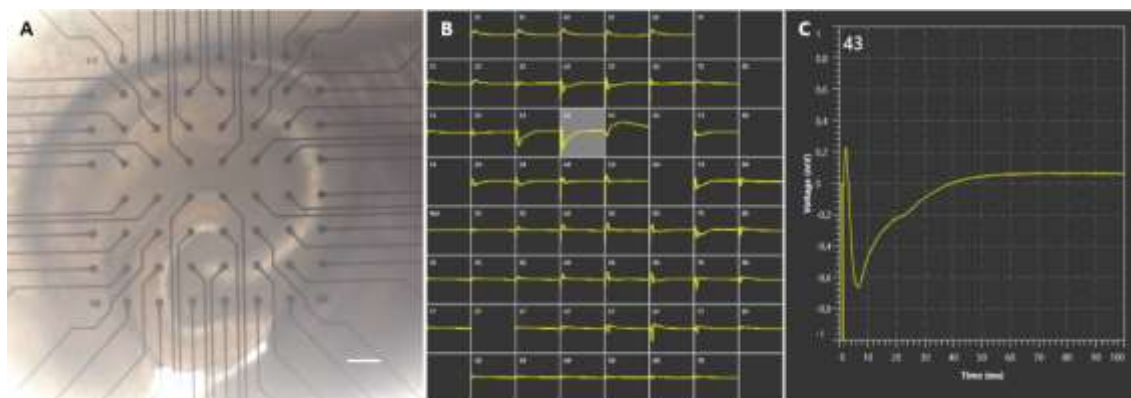
### *3.7. Electrofisiología en rodajas agudas de hipocampo.*

Tras la puesta a punto de la técnica de electrofisiología mediante MEAs descrita en el **Anexo I**, se estableció el protocolo para el estudio de la mGluR-LTD Gp I que se describe a continuación.

Se emplearon ratones WT y Ts1Cje con edades comprendidas entre P21 y P30, y los experimentos se realizaron a ciegas para el genotipo. Los ratones se anestesiaron y decapitaron, y se extrajo el cerebro rápidamente (menos de 1 min). El cerebro se lavó en ACSFs a 4-8°C, con suministro constante de carbógeno. La composición del ACSFs es: KCl 2,5 mM (Sigma, Ref. P9541); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O) 1,25 mM (Sigma, Ref. P71505); NaHCO<sub>3</sub> 26 mM (Sigma, Ref. S5761); glucosa 25 mM (Sigma, Ref. G5400); CaCl<sub>2</sub> (2H<sub>2</sub>O) 0,5 mM (Sigma, Ref. 223506); MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O) 4 mM (Sigma, Ref. 63138); sacarosa 185 mM (Sigma, Ref. P84097). Este lavado con ACSFs se realizó durante menos de 30 segundos y, seguidamente, el cerebro se dispuso en la plataforma de corte sobre una capa de etilcianoacrilato. Una vez colocado en la cámara de corte del vibratomo (Vibratome 3000, Sectioning System), el cerebro se sumergió en ACSFs y se inició el procedimiento de corte, controlando la temperatura entre 2-8°C, con suministro constante de carbógeno. Se obtuvieron cortes horizontales de 350 µm de los cuales se aislaron los hipocampos, conservando parte de corteza entorrinal adyacente a la región CA1. Los cortes fueron transferidos a una cámara de incubación con ACSF (NaCl 126 mM; KCl 3 mM; MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O) 1,3 mM; CaCl<sub>2</sub> (2H<sub>2</sub>O) 2 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O) 1,25 mM; NaHCO<sub>3</sub> 24 mM; glucosa 10 mM) a 34°C con suministro constante de carbógeno durante 30 minutos. Tras los 30 minutos de recuperación, las rodajas se mantuvieron a RT durante al menos 2 horas y se sometieron a registro en MEA 3D (Anexo I).

La rodaja a registrar se dispuso en la cámara del MEA 3D sobre los electrodos (**Fig. 9**) con la ayuda de un pincel, se retiró el ACSF de la cámara y se colocó una rejilla sobre la rodaja. A continuación, se añadió ACSF hasta mantener la rodaja sumergida, y se inició el sistema de perfusión de ACSF a RT y suministro constante de carbógeno, con un flujo de 2 ml/minuto. Antes de iniciar el protocolo de estimulación y registro, las rodajas se mantuvieron 10 minutos en la cámara del MEA para su estabilización.

Las rodajas fueron estimuladas mediante pulso bifásico (fase negativa-fase positiva, pulso cuadrado y 100 ms por fase) con una amplitud de  $\pm 1.750$  mV para comprobar la viabilidad y respuesta de la rodaja. Se seleccionaron las rodajas que mostraron una respuesta de amplitud superior a los 100  $\mu$ V. Para cada rodaja se determinó la curva input/output, sometiéndola a voltajes con amplitudes ascendentes desde  $\pm 750$  mV a  $\pm 4.000$  mV, aplicando 3 estímulos para cada amplitud con un intervalo entre estímulos de 1 minuto. El nivel de respuesta basal se ajustó al 60% de la pendiente de la respuesta máxima obtenida al máximo voltaje aplicado, y se estimuló a una frecuencia de 0,0167 Hz (1 estímulo por minuto). Tras obtener un nivel de respuesta basal estable, se aplicó el tratamiento con DHPG a una concentración 100  $\mu$ M durante 5 minutos, suministrado a un flujo de 2 ml/min, con objeto de producir la mGluR-LTD Gp1. Durante la aplicación del fármaco se mantuvo el protocolo de estimulación y registro, y se prolongó 1 hora tras finalizar el tratamiento (**Fig. 10**). Los registros fueron adquiridos a una frecuencia de 10.000 Hz.

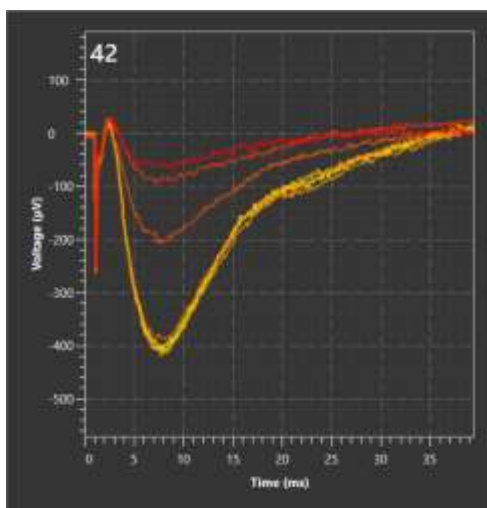


**Figura 9. Rodaja de hipocampo en el dispositivo MEA y actividad eléctrica detectada en respuesta a estímulo.** (A) Rodaja de hipocampo dispuesta sobre la matriz de electrodos del dispositivo MEA (barra de escala: 200  $\mu$ m). (B) Actividad eléctrica detectada en cada electrodo del dispositivo MEA en respuesta a un estímulo en electrodo 53 (los electrodos 27, 63 y 64 están apagados). (C) Actividad eléctrica detectada en uno de los electrodos (electrodo 43) en la región *stratum radiatum* de la CA1 del hipocampo en respuesta a estímulo.

El parámetro utilizado para medir la eficacia sináptica fue la pendiente de la curva inicial del fEPSP (*field Excitatory Post-Synaptic Potential*), tomándose el segmento comprendido entre el 10% y el 90% de la amplitud.



Los resultados de los experimentos de electrofisiología se presentan como la media  $\pm$  SEM normalizada respecto a la pendiente de la respuesta basal (100%). Para el análisis estadístico se realizó el test t-Student comparando los grupos experimentales. En las comparaciones se muestra el valor medio normalizado para cada condición en el minuto 60 tras el inicio del tratamiento con DHPG.



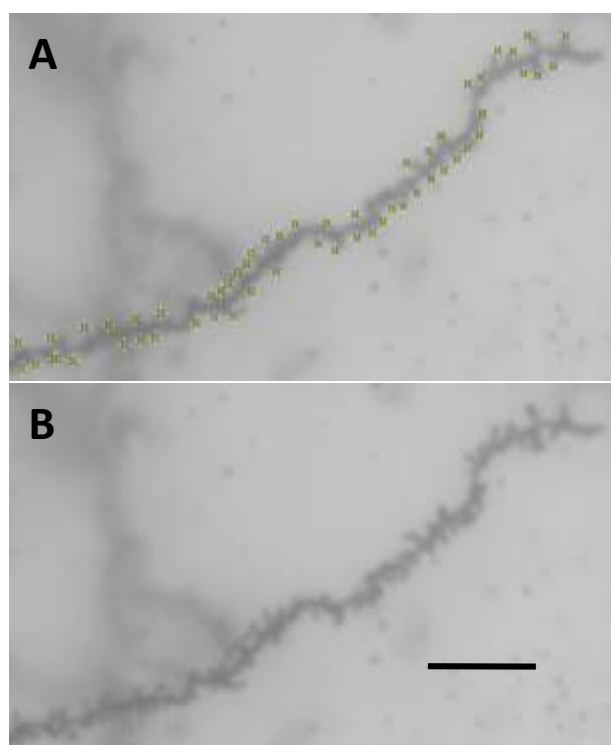
**Figura 10. Efecto del DHPG sobre el fEPSP en la región *stratum radiatum* de la CA1 del hipocampo.** Se muestran 8 fEPSPs consecutivos en el tiempo: 5 fEPSP de línea base y 3 fEPSP post-DHPG. En la figura se observa la depresión aguda en la respuesta eléctrica de la rodaja en la región *stratum radiatum* de la CA1 tras la aplicación de DHPG 100  $\mu$ M. La progresión de los fEPSPs se muestra con código de colores (orden cronológico de amarillo a rojo).

### 3.8. Tinción de Golgi.

Para la tinción de Golgi, los ratones (P18) se anestesiaron y decapitaron, y se extrajo el cerebro. Se separaron ambos hemisferios cerebrales y se descartó el cerebelo. Para la tinción se empleó el kit FD Rapid Golgi stain (FD NeuroTechnologies INC., Ref. PK401A) y se siguieron las indicaciones del fabricante. Tras el proceso de tinción los cerebros fueron seccionados en criostato (Leica CM1950) generando cortes coronales de 100  $\mu$ m. Los cortes se depositaron sobre portaobjetos Menzel-Gläse Superfrost PLUS (ThermoScientific, Ref. J1800AMNZ) y se cubrieron con una fina capa de gelatina (PanReac, Ref. 251336) al 0,5% disuelta en agua destilada y etanol 98% a partes iguales. Para el montaje de los cubreobjetos se empleó ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen, Ref. P36931).

Se adquirieron imágenes de las dendritas secundarias de la región *stratum radiatum* de la CA1 del hipocampo a una resolución de 1.600x1.200 con microscopio Olympus BX61 (software CellSens). Las imágenes empleadas para el análisis de la morfología de las espinas dendríticas se adquirieron con un objetivo UPlanSApo60x/1.35 aceite, con magnificación ocular 10x y una magnificación adicional 2x. Para el análisis de la densidad de espinas dendríticas se emplearon imágenes adquiridas con un objetivo UPlanApo40x/0.85 aire, con magnificación ocular 10x y una magnificación adicional 2x.

Para determinar la densidad de espinas se contaron manualmente las espinas de dendritas secundarias de la región CA1 (**Fig. 11**), y se midió la longitud de los fragmentos analizados empleando el software ImageJ. Para el estudio de la morfología de espinas dendríticas se aislaron las espinas de fragmentos dendríticos de dendritas secundarias de la CA1 en las imágenes, y se definió manualmente el perímetro de cada espina. Se evaluaron dos parámetros: el diámetro de la cabeza de la espina (medido con el software ImageJ) y el tipo morfológico de la espina, en base a tres categorías: “*mushrooms*”, “*stubby*” y filopodios. El análisis de la densidad de espinas, así como el de la morfología de las espinas se llevó a cabo a ciegas para el genotipo de las muestras.



**Figura 11. Conteo manual de espinas dendríticas.** (A) Marcaje manual de espinas dendríticas en una dendrita típica. (B) Misma imagen que en el panel A, sin marcar. Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

Para el análisis estadístico de la densidad de espinas dendríticas se aplicó el test t-Student comparando ambos genotipos, o bien comparando cada grupo sin tratar con su correspondiente grupo tratado con rapamicina. Para el análisis de la morfología de espinas dendríticas se aplicó Z-test para la comparación de las proporciones de las diferentes categorías de espinas, así como para la comparación de la distribución de las espinas en base a su diámetro.



## **4. RESULTADOS**

## 4. Resultados.

### 4.1. Análisis proteómico de SNs de hipocampo de ratones control y Ts1Cje adultos, tratados o no con rapamicina.

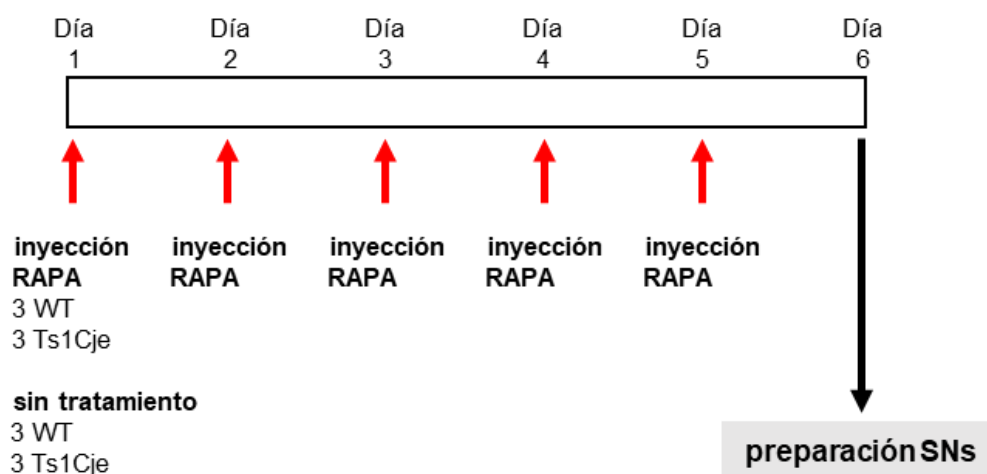
Como se indicó en la Introducción, estudios previos del laboratorio, en colaboración con el grupo del Dr. Antonio Rodríguez-Moreno (Universidad Pablo de Olavide, Sevilla), pusieron de manifiesto un déficit de la persistencia de la memoria espacial a largo plazo en los ratones Ts1Cje, empleando el test de Barnes, que se restauraba mediante el tratamiento de los ratones con rapamicina (Andrade-Talavera et al., 2015). En un estudio posterior de nuestro laboratorio también se observó un déficit en el reconocimiento de objetos nuevos (*novel object recognition*, NOR) en los ratones Ts1Cje, que se veía ligeramente mejorado tras ser tratados con rapamicina (Dra. Itziar Benito, datos no publicados). Por otra parte, en cuanto a alteraciones de plasticidad sináptica, los ratones Ts1Cje presentan una disminución de la LTP en la región CA1 del hipocampo (Siarey et al., 2005) y en el giro dentado (Belichenko et al., 2007), así como una ausencia total de la BDNF-LTP en la región CA1, que se recupera en este último caso en presencia de rapamicina (Andrade-Talavera et al., 2015).

Con objeto de identificar las diferencias a nivel sináptico que podrían ser relevantes para explicar las alteraciones de plasticidad y memoria en los ratones Ts1Cje, así como el efecto terapéutico de la rapamicina, se llevó a cabo un análisis proteómico de SNs de hipocampo de ratones WT y Ts1Cje, tratados o no con rapamicina.

Para ello se empleó una pauta de tratamiento similar a la utilizada en nuestro laboratorio en el test NOR, consistente en una inyección intraperitoneal de rapamicina diaria (dosis: 10 mg/kg) durante los 5 días previos al aislamiento de los SNs (**Fig. 12**). Una vez aislados los SNs, se obtuvieron muestras de proteína que se sometieron a iTRAQ 8-plex (Servicio de Proteómica del Instituto de Biomedicina de Sevilla, IBiS), de modo que cada muestra de proteína se marcó por duplicado. Se cuantificaron los niveles de proteínas detectadas en cada muestra, y se referenciaron a una de las muestras WT sin tratar (**Tabla S1, Archivo Suplementario 1**).

Mediante esta aproximación se identificaron 1.890 proteínas considerando la presencia de al menos dos péptidos únicos (**Tabla S2, Archivo Suplementario 1**). Las proteínas que no se detectaron en todas las muestras (4 proteínas) se descartaron, así como los replicados técnicos cuyo coeficiente de variación fue superior al 30% (19 proteínas).

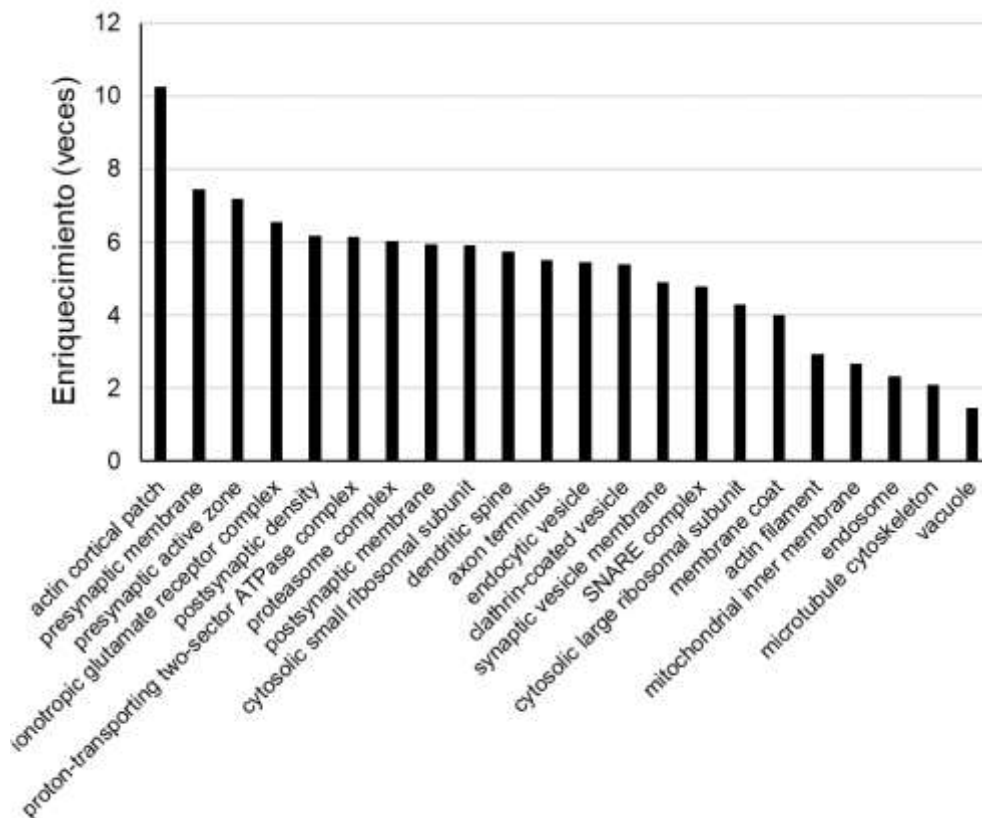
A continuación, y dado que los datos utilizados representaban proporciones, se calculó la media geométrica de la cantidad relativa de cada proteína en los duplicados técnicos (**Tabla S3, Archivo Suplementario 1**), y estos datos se analizaron mediante el software IPA.



**Figura 12. Esquema del tratamiento de ratones adultos con rapamicina previo al aislamiento de SNs de hipocampo.** Se indica el esquema temporal del tratamiento, así como el número de ratones utilizados.

Previamente al análisis proteómico mediante IPA, y con objeto de verificar que las proteínas detectadas eran mayoritariamente sinápticas, la lista de proteínas incluidas en la Tabla S3 se analizó mediante un test de sobre-representación, utilizando la herramienta informática PANTHER (Mi et al., 2021). Para ello se seleccionó el conjunto de datos anotados denominado “*PANTHER Go-Slim Cellular Component*”, de modo que se identificaron los grupos de proteínas sobre-representadas en las muestras de SNs, atendiendo al criterio de componente celular y comparando con el genoma completo de ratón. Como era esperable, se observó un gran enriquecimiento en proteínas pre- y post-sinápticas (**Fig. 13 y Tabla S4, Archivo Suplementario 1**), confirmando la calidad de las preparaciones de SNs obtenidas.

De las 1.867 proteínas inicialmente incluidas en el análisis IPA, 12 de ellas resultaron no estar mapeadas, y de las 1.855 identidades mapeadas, IPA marcó 1.824 como “*análisis ready*”.



**Figura 13. Test de sobre-representación PANTHER de las proteínas identificadas por iTRAQ en muestras de SNs de hipocampo sometidas a análisis proteómico.** Se muestran los componentes celulares sobre-representados en los SNs. El enriquecimiento se indica como número de veces, comparando con el genoma completo de ratón. Para mayor claridad, solo se han incluido en la figura las subclases más específicas del conjunto de datos anotados “*PANTHER Go-Slim Cellular Component*”. El análisis completo se muestra en la Tabla S4 del Archivo Suplementario 1).

Al establecer un *cutoff* de 1,2 veces (véase Materiales y Métodos), 116 proteínas resultaron estar desreguladas (108 al alza y 8 a la baja) en los SNs Ts1Cje, comparando con los SNs WT (**Tabla 4**).

En los SNs del grupo Ts1Cje tratados con rapamicina (Ts1Cje RAPA), 88 proteínas resultaron estar afectadas (58 al alza y 30 a la baja) (**Tabla 5**), comparando con los SNs WT.

Finalmente, en el grupo de SNs WT tratados con rapamicina (WT RAPA), 130 proteínas aparecían desreguladas (104 al alza y 26 a la baja), comparando con los SNs WT (**Tabla 6**).



**Tabla 4. Proteínas afectadas en SNs de hipocampo de ratones Ts1Cje, comparando con SNs WT.**

Cambio de expresión (veces)	ID	Símbolo	Gen
1.344	P51830	ADCY9	adenylate cyclase 9
-1.266	Q3TBU7	AGFG2	ArfGAP with FG repeats 2
-1.213	E9Q414	APOB	apolipoprotein B
1.246	P12023	APP	amyloid beta precursor protein
1.334	E9PYT0	ARHGAP5	Rho GTPase activating protein 5
1.337	Q8VDN2	ATP1A1	ATPase Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting subunit alpha 1
1.667	Q6PIE5	ATP1A2	ATPase Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting subunit alpha 2
1.639	Q6PIC6	ATP1A3	ATPase Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting subunit alpha 3
1.415	P14094	ATP1B1	ATPase Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting subunit beta 1
1.595	P14231	ATP1B2	ATPase Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting subunit beta 2
1.251	O55143	ATP2A2	ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> transporting 2
1.329	G5E829	ATP2B1	ATPase plasma membrane Ca <sup>2+</sup> transporting 1
1.268	F8WHB1	ATP2B2	ATPase plasma membrane Ca <sup>2+</sup> transporting 2
1.536	Q06185	Atp5k	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1F0 complex, subunit E
1.925	P56135	ATP5MF	ATP synthase membrane subunit f
1.523	Q9DCX2	ATP5PD	ATP synthase peripheral stalk subunit d
1.907	P97450	ATP5PF	ATP synthase peripheral stalk subunit F6
1.300	P51863	ATP6V0D1	ATPase H <sup>+</sup> transporting V0 subunit d1
1.314	P97445	CACNA1A	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A
1.474	Q5SUF8	CACNA1G	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 G
1.262	O08532	CACNA2D1	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 1
1.529	Q9JKC6	CEND1	cell cycle exit and neuronal differentiation 1
1.299	B1ATV0	CLCN5	chloride voltage-gated channel 5
1.225	Q60936	COQ8A	coenzyme Q8A
1.818	P19783	COX4I1	cytochrome c oxidase subunit 4I1
1.889	P12787	COX5A	cytochrome c oxidase subunit 5A
2.119	Q9CPQ1	Cox6c	cytochrome c oxidase subunit 6C
-1.630	F6XLV1	CROCC2	ciliary rootlet coiled-coil, rootletin family member 2
1.241	E0CXB9	CTNNA2	catenin alpha 2
1.728	Q9DOM3	CYC1	cytochrome c1
1.976	P62897	CYCS	cytochrome c, somatic
-1.487	A2A8E2	CZIB	CXXC motif containing zinc binding protein
1.330	O08749	DLD	dihydrolipoamide dehydrogenase
-1.334	Q9QYJ0	DNAJA2	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A2
1.406	F8VPQ1	DOCK3	dedicator of cytokinesis 3
-1.226	Q9Z2I2	FKBP1B	FKBP prolyl isomerase 1B
1.257	P45878	FKBP2	FKBP prolyl isomerase 2
-1.252	Q9WV18	GABBR1	gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1
1.335	Q9CR59	GADD45GIP1	GADD45G interacting protein 1
-1.403	Q9QUH0	GLRX	glutaredoxin

1.267	E9PVN6	Gm20498	predicted gene 20498
-1.440	Q9CQI3	GMFB	glia maturation factor beta
1.207	E9QKR0	GNB2	G protein subunit beta 2
-1.212	P63213	GNG2	G protein subunit gamma 2
1.549	Q64521	GPD2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2
1.481	P23819	GRIA2	glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2
-1.251	Q9Z2W8	GRIA4	glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4
1.758	A2AI21	GRIN1	glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1
1.371	Q01097	GRIN2B	glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B
1.200	Q3UVX5	GRM5	glutamate metabotropic receptor 5
1.245	P38060	HMGCL	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase
1.267	Q9JHR7	IDE	insulin degrading enzyme
2.076	Q8CAQ8	IMMT	inner membrane mitochondrial protein
1.259	Q9ERG0	LIMA1	LIM domain and actin binding 1
-1.211	Q8JZS0	LIN7A	lin-7 homolog A, crumbs cell polarity complex component
1.265	A9DA50	LINGO1	leucine rich repeat and Ig domain containing 1
1.246	Q3UYG8	MACROD2	mono-ADP ribosylhydrolase 2
1.235	Q8BW75	MAOB	monoamine oxidase B
-1.254	P26645	Marcks	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate
1.202	Q99KE1	ME2	malic enzyme 2
1.206	P34884	MIF	macrophage migration inhibitory factor
1.696	Q9D2P8	MOBP	myelin-associated oligodendrocyte basic protein
1.506	Q3UY21	MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein
1.590	P03930	mt-Atp8	ATP synthase F0 subunit 8
2.804	P00405	MT-CO2	cytochrome c oxidase subunit II
-1.289	Q9Z2D1	MTMR2	myotubularin related protein 2
1.337	Q9CQ75	NDUFA2	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A2
1.331	Q62425	NDUFA4	NDUFA4 mitochondrial complex associated
1.546	Q9DCJ5	NDUFA8	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A8
1.359	A2AQ17	NDUFAF1	NADH:ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 1
1.265	A2APY7	NDUFAF5	NADH:ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 5
1.813	Q91VD9	NDUFS1	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S1
1.713	Q9DCT2	NDUFS3	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S3
1.368	P52503	NDUFS6	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit S6
1.487	Q9D6J6	NDUFV2	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit V2
1.313	A2AGI2	NLGN3	neuroligin 3
1.260	P97300	Nptn	neuroplastin
1.232	Q9CWD8	NUBPL	nucleotide binding protein like
1.306	Q8CFX3	PCDH1	protocadherin 1
1.238	E9Q1A0	PDE4DIP	phosphodiesterase 4D interacting protein
-1.296	Q9JJV2	PFN2	profilin 2

2.173	P67778	PHB	prohibitin
1.752	P60202	PLP1	proteolipid protein 1
1.226	Q99NF7	PPM1B	protein phosphatase, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> dependent 1B
-1.228	Q61171	PRDX2	peroxiredoxin 2
-1.307	Q9QUK9	PRSS3	serine protease 3
1.222	E9PZ00	PSAP	prosaposin
1.215	Q9CZT8	RAB3B	RAB3B, member of RAS oncogene family
1.300	P61226	RAP2B	RAP2B, member of RAS oncogene family
1.251	E9Q401	RYR2	ryanodine receptor 2
-1.361	A0A0A0MQ90	S100A13	S100 calcium binding protein A13
1.375	Q91V61	SFXN3	sideroflexin 3
1.860	Q8BH59	SLC25A12	solute carrier family 25 member 12
1.591	P48962	SLC25A4	solute carrier family 25 member 4
1.214	Q9CQS4	SLC25A46	solute carrier family 25 member 46
1.329	P10852	SLC3A2	solute carrier family 3 member 2
-1.211	A3KGU7	SPTAN1	spectrin alpha, non-erythrocytic 1
1.204	P05480	SRC	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
1.209	Q99JB2	STOML2	stomatin like 2
1.236	P61264	STX1B	syntaxin 1B
1.222	P63046	SULT4A1	sulfotransferase family 4A member 1
-1.209	Q9CUU3	SYCP2	synaptonemal complex protein 2
1.374	D3Z4L9	TNFAIP2	TNF alpha induced protein 2
1.630	D3Z2H9	Tpm3-rs7	tropomyosin 3, related sequence 7
1.249	Q91W90	TXNDC5	thioredoxin domain containing 5
-1.276	A0A0A6YXY0	TXNDC9	thioredoxin domain containing 9
1.223	O70481	UBR1	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1
-1.281	P61961	UFM1	ubiquitin fold modifier 1
1.928	Q9CQB4	UQCRB	ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein
1.687	Q9CZ13	UQCRC1	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1
3.192	Q9CR68	UQCRFS1	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1
2.522	Q9CQ69	UQCRQ	ubiquinol-cytochrome c reductase complex III subunit VII
1.762	Q60932	VDAC1	voltage dependent anion channel 1
2.043	Q60930	VDAC2	voltage dependent anion channel 2
-1.341	O09053	WRN	Werner syndrome RecQ like helicase
-1.240	Q810J8	ZFYVE1	zinc finger FYVE-type containing 1

**Tabla 5. Proteínas afectadas en SNs de hipocampo de ratones Ts1Cje tratados con rapamicina (Ts1Cje RAPA), comparando con SNs WT sin tratar.**

Cambio de expresión (veces)	ID	Símbolo	Gen
1.242	Q9CQR4	ACOT13	acyl-CoA thioesterase 13
1.281	P10518	ALAD	aminolevulinate dehydratase
1.311	E9PYT0	ARHGAP5	Rho GTPase activating protein 5
-1.226	Q9ES28	ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor 7
-1.207	Q91ZU0	ASB7	ankyrin repeat and SOCS box containing 7
1.350	Q8C0M9	ASRGL1	asparaginase like 1
-1.461	Q9D3D9	ATP5F1D	ATP synthase F1 subunit delta
1.265	P56135	ATP5MF	ATP synthase membrane subunit f
1.253	P51863	ATP6V0D1	ATPase H <sup>+</sup> transporting V0 subunit d1
1.308	Q9Z0S1	BPNT1	3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase 1
1.239	P00920	CA2	carbonic anhydrase 2
-1.222	A0A0A6YY67	CAMSAP2	calmodulin regulated spectrin associated protein family member 2
-1.206	D3YYT0	CDH2	cadherin 2
-1.267	O55229	CHKB	choline kinase beta
1.928	P62897	CYCS	cytochrome c, somatic
-1.256	A2A8E2	CZIB	CXXC motif containing zinc binding protein
1.225	E9QMK9	DGLUCY	D-glutamate cyclase
-1.245	Q6PGC1	DHX29	DExH-box helicase 29
1.311	O08749	DLD	dihydrolipoamide dehydrogenase
-1.341	Q9QYJ0	DNAJA2	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A2
1.360	Q91WT4	DNAJC17	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C17
1.484	P63168	DYNLL1	dynein light chain LC8-type 1
1.493	D6RIN4	DYNLL2	dynein light chain LC8-type 2
-1.203	Q8BGB7	ENOPH1	enolase-phosphatase 1
-1.206	Q05816	FABP5	fatty acid binding protein 5
1.229	A2RT62	FBXL16	F-box and leucine rich repeat protein 16
1.213	Q61578	FDXR	ferredoxin reductase
-1.293	Q9Z2I2	FKBP1B	FKBP prolyl isomerase 1B
1.321	P45878	FKBP2	FKBP prolyl isomerase 2
1.341	Q8BFQ8	GATD1	glutamine amidotransferase like class 1 domain containing 1
-1.210	Q6DFZ1	GBF1	golgi brefeldin A resistant guanine nucleotide exchange factor 1
1.387	Q80Y14	GLRX5	glutaredoxin 5
-1.357	V9GXQ2	Gm17087	predicted gene 17087
1.207	E9PVN6	Gm20498	predicted gene 20498
-1.216	A2A9H6	Gm884	predicted gene 884
1.205	P62874	GNB1	G protein subunit beta 1
-1.319	P63213	GNG2	G protein subunit gamma 2
1.258	Q3ULJ0	GPD1L	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like
1.203	Q68EF4	GRM4	glutamate metabotropic receptor 4

1.254	Q9D114	HDDC3	HD domain containing 3
1.439	Q8BGZ1	HPCAL4	hippocalcin like 4
1.281	P54071	IDH2	isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2, mitochondrial
1.664	Q9QXM1	JMY	junction mediating and regulatory protein, p53 cofactor
-1.336	Q8CD76	KLC1	kinesin light chain 1
1.478	Q9CPR6	Krt88	keratin 88
1.453	Q9ERG0	LIMA1	LIM domain and actin binding 1
-1.268	Q8JZS0	LIN7A	lin-7 homolog A, crumbs cell polarity complex component
1.373	Q3TMX5	MANF	mesencephalic astrocyte derived neurotrophic factor
1.213	Q99KE1	ME2	malic enzyme 2
1.268	Q8BMF3	ME3	malic enzyme 3
1.323	P34884	MIF	macrophage migration inhibitory factor
1.269	Q9D1P0	MRPL13	mitochondrial ribosomal protein L13
-1.292	Q9Z2D1	MTMR2	myotubularin related protein 2
1.220	P09405	NCL	nucleolin
-1.241	Q8BTG7	NDRG4	NDRG family member 4
1.317	A2AQ17	NDUFAF1	NADH:ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 1
1.257	Q9CWD8	NUBPL	nucleotide binding protein like
1.275	E9Q1A0	PDE4DIP	phosphodiesterase 4D interacting protein
1.214	P62962	PFN1	profilin 1
1.287	O35954	PITPNM1	phosphatidylinositol transfer protein membrane associated 1
1.581	A3KGF7	PLCB2	phospholipase C beta 2
1.237	P63330	PPP2CA	protein phosphatase 2 catalytic subunit alpha
1.416	E9PZ00	PSAP	prosaposin
1.304	Q9CZT8	RAB3B	RAB3B, member RAS oncogene family
1.304	A2AC13	RAC3	Rac family small GTPase 3
-1.245	Q99N57	RAF1	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase
1.237	Q6QI06	RICTOR	RPTOR independent companion of MTOR complex 2
1.257	P62830	RPL23	ribosomal protein L23
1.287	Q924D0	RTN4IP1	reticulon 4 interacting protein 1
1.220	P70275	SEMA3E	semaphorin 3E
1.233	P28661	SEPT4	septin 4
-1.230	E9Q4B1	SPERT	spermatid associated
-1.206	Q9CUU3	SYCP2	synaptonemal complex protein 2
1.238	A2A690	TANC2	tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 2
-1.271	P01831	THY1	Thy-1 cell surface antigen
1.525	D3Z4L9	TNFAIP2	TNF alpha induced protein 2
1.462	D3Z2H9	Tpm3-rs7	tropomyosin 3, related sequence 7
-1.226	Q9D6E4	TTC9B	tetratricopeptide repeat domain 9B
-1.240	P68372	TUBB4B	tubulin beta 4B class IVb
1.273	Q91W90	TXNDC5	thioredoxin domain containing 5
-1.279	P61079	UBE2D3	ubiquitin conjugating enzyme E2 D3
1.232	O70481	UBR1	ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 1

1.204	Q4FE56	USP9X	ubiquitin specific peptidase 9 X-linked
1.227	Q8CCB4	VPS53	VPS53 subunit of GARP complex
1.288	Q5SXA9	WWC1	WW and C2 domain containing 1
-1.202	F8VQ87	XRN1	5'-3' exoribonuclease 1
-1.207	P62960	YBX1	Y-box binding protein 1
-1.308	Q810J8	ZFYVE1	zinc finger FYVE-type containing 1

**Tabla 6. Proteínas afectadas en SNs de hipocampo de ratones WT tratados con rapamicina (WT RAPA), comparando con SNs WT sin tratar.**

Cambio de expresión (veces)	ID	Símbolo	Gen
1.240	P61922	ABAT	4-aminobutyrate aminotransferase
1.267	Q6PE15	ABHD10	abhydrolase domain containing 10
1.323	Q9CQR4	ACOT13	acyl-CoA thioesterase 13
1.210	P51830	ADCY9	adenylate cyclase 9
1.381	P10518	ALAD	aminolevulinatase dehydratase
1.245	Q9CZS1	ALDH1B1	aldehyde dehydrogenase 1 family member B1
1.252	P47738	ALDH2	aldehyde dehydrogenase 2 family member
-1.311	E9Q414	APOB	apolipoprotein B
-1.321	Q9ES28	ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor 7
-1.204	Q91ZU0	ASB7	ankyrin repeat and SOCS box containing 7
1.205	Q8C0M9	ASRGL1	asparaginase like 1
-1.233	Q9D906	ATG7	autophagy related 7
1.203	P56480	ATP5F1B	ATP synthase F1 subunit beta
-1.209	Q9D3D9	ATP5F1D	ATP synthase F1 subunit delta
1.239	P97450	ATP5PF	ATP synthase peripheral stalk subunit F6
1.254	P51863	ATP6V0D1	ATPase H <sup>+</sup> transporting V0 subunit d1
-1.218	Q9Z1G3	ATP6V1C1	ATPase H <sup>+</sup> transporting V1 subunit C1
1.286	Q9Z0S1	BPNT1	3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase 1
-1.311	Q2MH31	C9orf24	chromosome 9 open reading frame 24
1.291	P00920	CA2	carbonic anhydrase 2
1.216	Q8K1Z0	COQ9	coenzyme Q9
-1.351	P63040	CPLX1	complexin 1
1.312	Q9CZU6	CS	citrate synthase
1.814	P62897	CYCS	cytochrome c, somatic
1.220	Q99LB2	DHRS4	dehydrogenase/reductase 4
-1.244	Q6PGC1	DHX29	DEXH-box helicase 29
1.477	O08749	DLD	dihydrolipoamide dehydrogenase
-1.310	Q9QYJ0	DNAJA2	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A2
1.260	Q91WT4	DNAJC17	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C17
1.309	P63168	DYNLL1	dynein light chain LC8-type 1
1.388	D6RIN4	DYNLL2	dynein light chain LC8-type 2

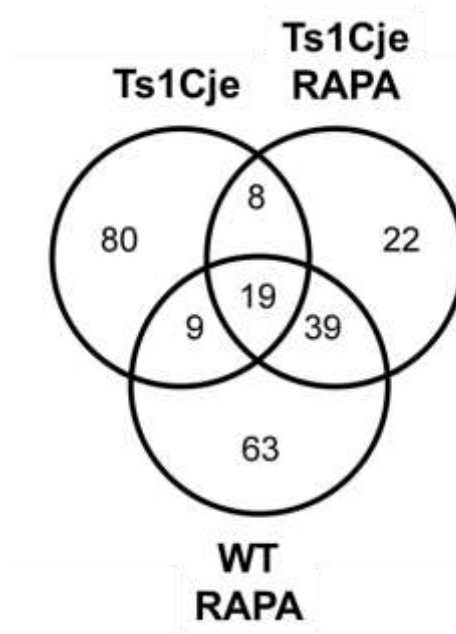
-1.262	Q05816	FABP5	fatty acid binding protein 5
1.222	Q8R0F8	FAHD1	fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 1
-1.308	Q9D9R9	Fam186a	family with sequence similarity 186, member A
1.314	Q80UW2	FBXO2	F-box protein 2
-1.238	Q8CIB5	FERMT2	fermitin family member 2
-1.284	Q9Z2I2	FKBP1B	FKBP prolyl isomerase 1B
1.353	P45878	FKBP2	FKBP prolyl isomerase 2
1.368	Q9WV18	GABBR1	gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1
1.317	P56476	GABRR2	gamma-aminobutyric acid type A receptor rho2 subunit
1.329	Q8BFQ8	GATD1	glutamine amidotransferase like class 1 domain containing 1
-1.206	Q6DFZ1	GBF1	golgi brefeldin A resistant guanine nucleotide exchange factor 1
-1.249	Q01514	GBP3	guanylate binding protein 3
-1.232	Q9QUH0	GLRX	glutaredoxin
1.282	Q80Y14	GLRX5	glutaredoxin 5
-1.332	V9GXQ2	Gm17087	predicted gene 17087
-1.251	W4VSN7	Gm3550	ribosomal protein L29 pseudogene
-1.242	A2A9H6	Gm884	predicted gene 884
-1.258	Q9CQI3	GMFB	glia maturation factor beta
-1.404	P63213	GNG2	G protein subunit gamma 2
1.254	P05202	GOT2	glutamic-oxaloacetic transaminase 2
1.234	Q3ULJ0	GPD1L	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like
-1.300	Q8BUV3	GPHN	gephyrin
-1.222	P39087	GRIK2	glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 2
1.503	B1AS29	GRIK3	glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 3
1.221	Q68EF4	GRM4	glutamate metabotropic receptor 4
1.320	Q80WM4	HAPLN4	hyaluronan and proteoglycan link protein 4
1.255	Q6PAV2	HERC4	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 4
-1.270	Q8CGP4	Hist1h2aa	histone cluster 1, H2aa
1.361	P38060	HMGCL	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase
-1.202	Q5EBP8	Hnrnpa1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
1.635	Q8BGZ1	HPCAL4	hippocalcin like 4
1.205	Q8BIJ6	IARS2	isoleucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial
1.286	P54071	IDH2	isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2, mitochondrial
1.221	Q9D6R2	IDH3A	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD(+)) alpha
-1.339	Q8CD76	KLC1	kinesin light chain 1
1.301	Q9CPR6	Krt88	keratin 88
-1.217	Q8BN59	LARP6	La ribonucleoprotein domain family member 6
-1.260	Q8JZS0	LIN7A	lin-7 homolog A, crumbs cell polarity complex component
1.217	Q3TMX5	MANF	mesencephalic astrocyte derived neurotrophic factor

-1.311	D3YYK8	Mapre2	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2
1.276	Q99KE1	ME2	malic enzyme 2
1.223	Q8BMF3	ME3	malic enzyme 3
1.338	P34884	MIF	macrophage migration inhibitory factor
1.213	Q3UW66	MPST	mercaptopyruvate sulfurtransferase
1.240	Q9D1P0	MRPL13	mitochondrial ribosomal protein L13
-1.213	Q9Z2D1	MTMR2	myotubularin related protein 2
-1.241	Q3UHD3	MTUS2	microtubule associated scaffold protein 2
1.210	P09405	NCL	nucleolin
1.277	Q62433	NDRG1	N-myc downstream regulated 1
-1.263	Q8BTG7	NDRG4	NDRG family member 4
1.244	Q8CEC5	NKIRAS1	NFKB inhibitor interacting Ras like 1
-1.303	Q99K48	NONO	non-POU domain containing octamer binding
1.244	A2A9Q2	NRDC	nardilysin convertase
1.210	Q3UHB1	NT5DC3	5'-nucleotidase domain containing 3
1.323	E9Q1A0	PDE4DIP	phosphodiesterase 4D interacting protein
1.219	Q9D051	PDHB	pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit
1.495	A3KGF7	PLCB2	phospholipase C beta 2
1.227	Q543K9	PNP	purine nucleoside phosphorylase
-1.369	Q8K1L5	PPP1R11	protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 11
1.278	P63330	PPP2CA	protein phosphatase 2 catalytic subunit alpha
1.381	P20108	PRDX3	peroxiredoxin 3
-1.202	P16054	PRKCE	protein kinase C epsilon
1.225	Q9QUK9	PRSS3	serine protease 3
1.306	E9PZ00	PSAP	prosaposin
1.235	Q9CZT8	RAB3B	RAB3B, member RAS oncogene family
-1.286	Q99N57	RAF1	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase
1.234	Q91ZZ2	RAPGEF1	Rap guanine nucleotide exchange factor 1
-1.230	D9HP81	RIMS2	regulating synaptic membrane exocytosis 2
-1.508	P70335	ROCK1	Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1
-1.314	P62281	RPS11	ribosomal protein S11
-1.201	Q9ES97	RTN3	reticulon 3
1.394	Q924D0	RTN4IP1	reticulon 4 interacting protein 1
-1.226	O08576	RUNDC3A	RUN domain containing 3A
-1.216	Q99J08	SEC14L2	SEC14 like lipid binding 2
1.237	A2AQE2	SECISBP2L	SECIS binding protein 2 like
1.376	P28661	SEPT4	septin 4
-1.230	Q8BJU0	SGTA	small glutamine rich tetratricopeptide repeat containing alpha
1.222	Q9CZN7	SHMT2	serine hydroxymethyltransferase 2
1.267	P09671	SOD2	superoxide dismutase 2
-1.238	Q52KF3	SPIRE1	spire type actin nucleation factor 1
1.279	P63046	SULT4A1	sulfotransferase family 4A member 1
-1.235	Q9CUU3	SYCP2	synaptonemal complex protein 2
1.208	Q920N7	SYT12	synaptotagmin 12
-1.286	Q3UH45	TECPR2	tectonin beta-propeller repeat containing 2
-1.209	P01831	THY1	Thy-1 cell surface antigen



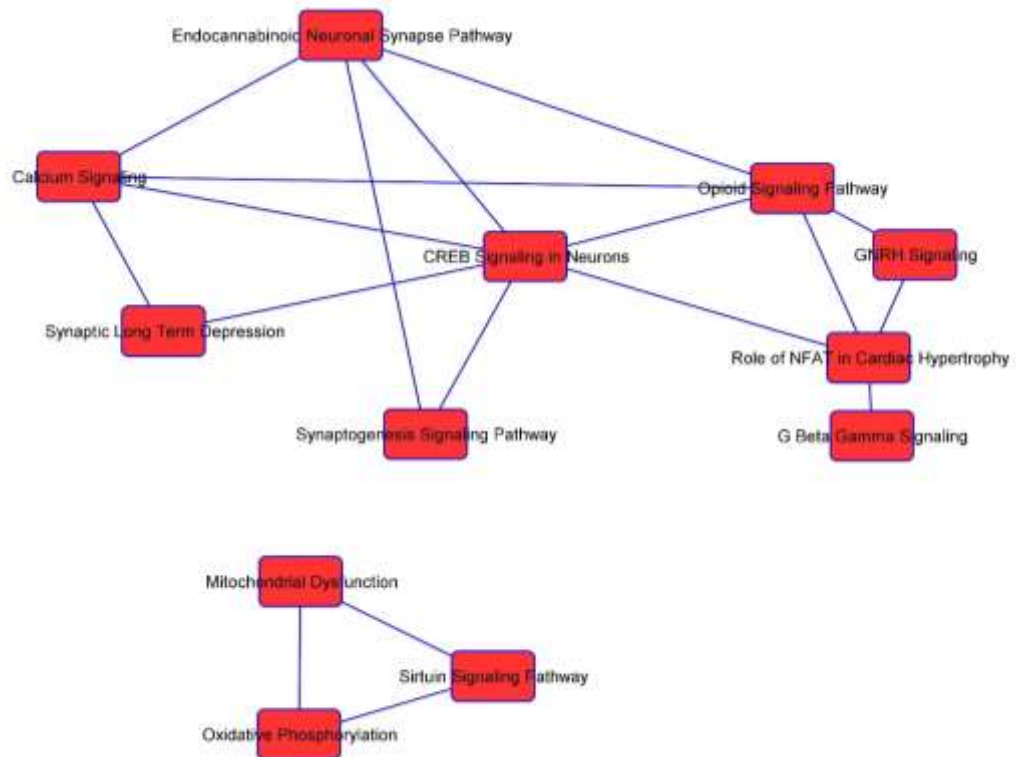
1.207	P62075	TIMM13	translocase of inner mitochondrial membrane 13
1.586	D3Z2H9	Tpm3-rs7	tropomyosin 3, related sequence 7
-1.216	Q7TMM9	TUBB2A	tubulin beta 2A class IIa
-1.268	P68372	TUBB4B	tubulin beta 4B class IVb
-1.200	Q9CQM5	TXNDC17	thioredoxin domain containing 17
1.416	Q91W90	TXNDC5	thioredoxin domain containing 5
-1.312	P61079	UBE2D3	ubiquitin conjugating enzyme E2 D3
1.210	O70481	UBR1	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1
-1.290	Q8K0T7	UNC13C	unc-13 homolog C
1.209	Q4FE56	USP9X	ubiquitin specific peptidase 9 X-linked
-1.235	Q6PEV3	WIPF2	WAS/WASL interacting protein family member 2
-1.203	P0C7L0	WIPF3	WAS/WASL interacting protein family member 3
1.262	Q5SXA9	WWC1	WW and C2 domain containing 1
-1.295	Q810J8	ZFYVE1	zinc finger FYVE-type containing 1

Al representar los datos mediante diagrama de Venn (**Fig. 14**), se pudo observar que existían 58 proteínas afectadas de forma similar en SNs WT RAPA y Ts1Cje RAPA (**Tabla S5, Archivo Suplementario 2**), lo que sugería que la alteración de los niveles de esas proteínas estaba vinculado al tratamiento con rapamicina, independientemente del genotipo.



**Figura 14. Diagrama de Venn de las proteínas desreguladas en SNs de hipocampo de ratones Ts1Cje y ratones Ts1Cje y WT tratados con rapamicina. Se muestra el número de proteínas solapantes entre los diferentes grupos experimentales.**

Atendiendo al valor  $p$  ( $p$ -value) en el test de Fischer, la herramienta IPA identificó que la vía canónica de disfunción mitocondrial y las vías de fosforilación oxidativa y de señalización de sirtuinas estaban entre las más enriquecidas en el conjunto de proteínas desreguladas en SNs Ts1Cje (**Fig 15** y **Tabla S6, Archivo Suplementario 2**). Estos resultados concuerdan con las alteraciones mitocondriales descritas en modelos murinos y en personas con SD (Valenti et al., 2014; 2018; Izzo et al., 2018).

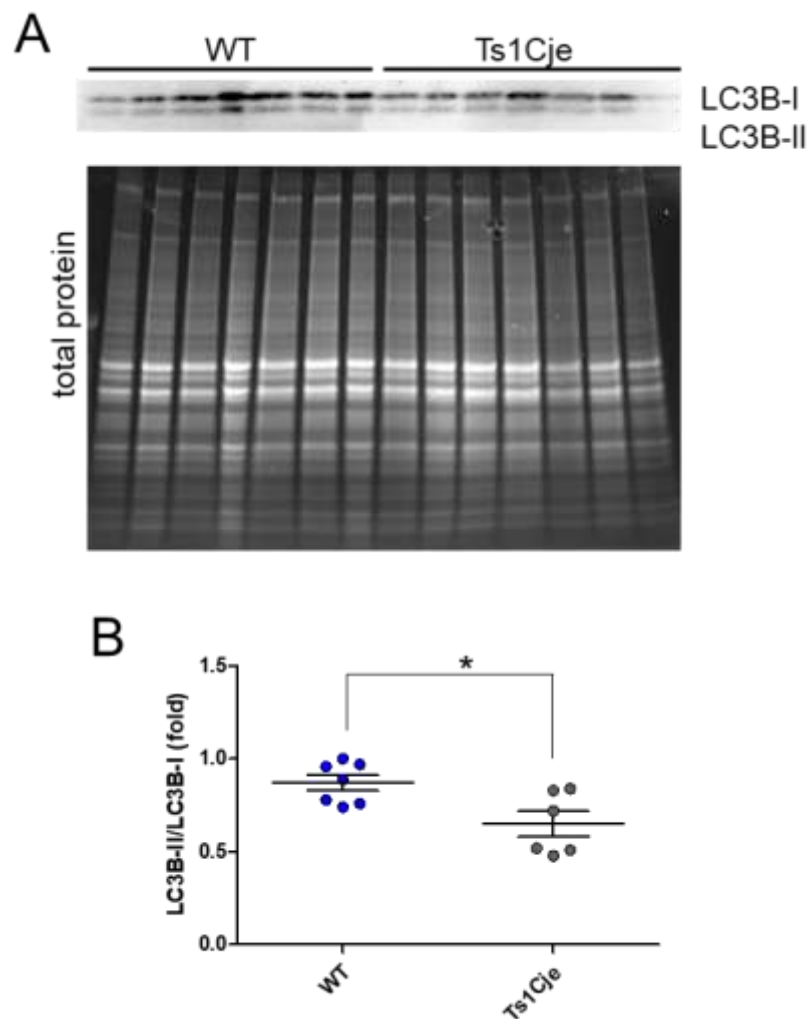


**Figura 15. Rutas canónicas establecidas por IPA afectadas en SNs Ts1Cje.** Se muestran las rutas canónicas más significativas identificadas por IPA entre las proteínas alteradas en SNs Ts1Cje. Las rutas solapantes que comparten al menos 7 proteínas se muestran conectadas mediante líneas sólidas.

Recientemente se ha descrito la acumulación de mitocondrias dañadas en fibroblastos de personas con SD, debido a la reducción de autofagia/mitofagia asociada a la hiperactividad de la vía mTOR (Bordi et al., 2019). Por tanto, se decidió estudiar si los procesos de autofagia y mitofagia estaban alterados en el hipocampo Ts1Cje. Para ello se utilizaron los marcadores LC3B-II y TOM20, respectivamente, cuyos niveles se cuantificaron mediante WB, a partir de muestras de hipocampo total de ratones adultos

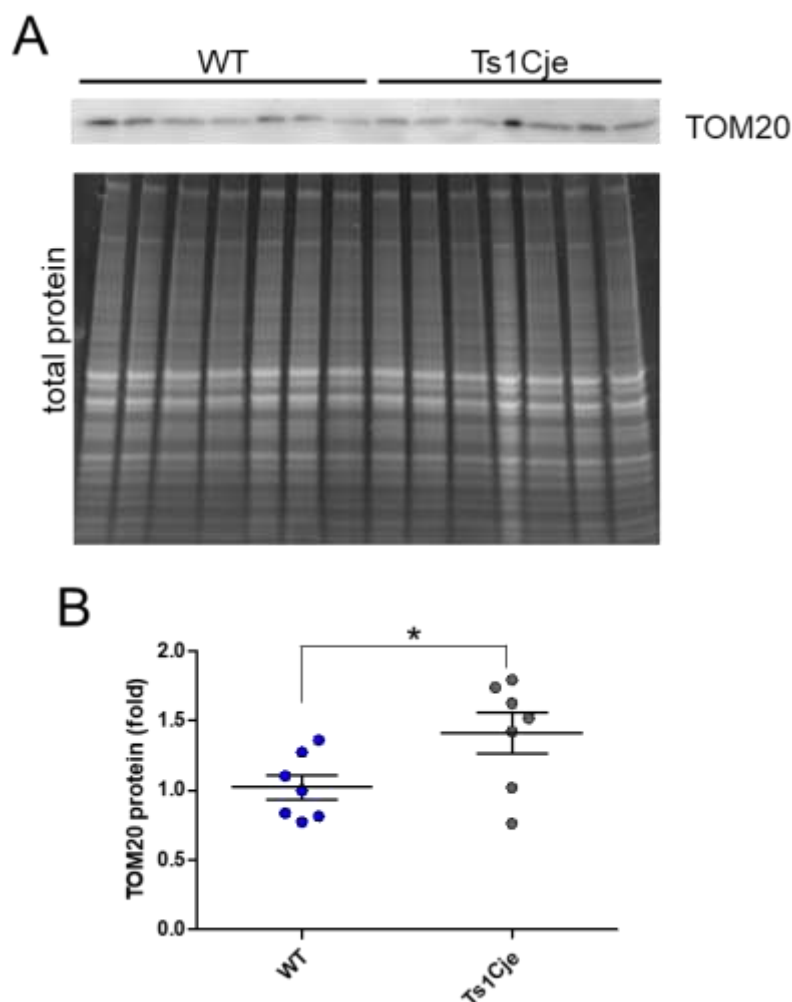
Ts1Cje y WT. LC3B-II es una isoforma de la cadena ligera 3 de la proteína asociada a microtúbulos 1A/1B, cuyo nivel correlaciona con el número de autofagosomas (Mizushima y Yoshimori, 2007). Por otra parte, TOM20 es la translocasa 20 de la membrana externa mitocondrial, y sirve como marcador de masa mitocondrial.

Los resultados obtenidos mostraron una reducción de LC3B-II en el hipocampo Ts1Cje respecto al silvestre (**Fig. 16**), sugiriendo una reducción de la autofagia, lo que estaría en consonancia con la hiperactivación de mTOR demostrada por nuestro grupo de investigación previamente (Troca-Marín et al., 2011) y con lo descrito recientemente en fibroblastos de personas con SD (Bordi et al., 2019).



**Figura 16. Cuantificación de la proteína LC3B-II en el hipocampo de ratones adultos WT y Ts1Cje.** (A) WB de las muestras de ratones WT y Ts1Cje hermanos de camada analizados, y proteína total cargada. (B) Cuantificación de los resultados mostrados en el panel A. Se muestra la proporción LC3B-II/LC3B-I como la media  $\pm$  SEM (WT:  $0,8714 \pm 0,04154$ ; Ts1Cje:  $0,6500 \pm 0,06802$ ;  $p = 0,0152$ , t-test de Student,  $n = 7$  para WT y  $n = 6$  para Ts1Cje).

Los resultados obtenidos referentes a TOM20 mostraron un incremento en el hipocampo Ts1Cje, en comparación al WT (**Fig. 17**), compatible con un mayor número de mitocondrias que podrían acumularse por reducción de la mitofagia.



**Figura 17. Cuantificación de la proteína TOM20 en el hipocampo de ratones adultos WT y Ts1Cje.** (A) WB de las muestras de ratones WT y Ts1Cje hermanos de camada analizados, y proteína total cargada. (B) Cuantificación de los resultados mostrados en el panel A. Las señales TOM20 se normalizaron por la proteína total correspondiente cargada en el gel, y se indica la media  $\pm$  SEM (WT:  $1,024 \pm 0,08799$ ; Ts1Cje:  $1,412 \pm 0,1452$ ;  $p = 0,0414$ , t-test de Student,  $n = 7$  animales por genotipo).

De forma interesante, al comparar los niveles relativos de proteínas pertenecientes a las rutas canónicas relacionadas con las mitocondrias entre los diferentes grupos experimentales (**Tabla 7**), se observó que los niveles de dichas proteínas eran similares

en SNs Ts1Cje RAPA y SNs WT, sugiriendo que el tratamiento con rapamicina rescatava el fenotipo mitocondrial de los ratones Ts1Cje.

Por otra parte, en el análisis mediante IPA también se observó la alteración en los SNs Ts1Cje de otras vías vinculadas a plasticidad sináptica, como son la señalización por calcio, la señalización mediada por CREB, la vía de señalización neuronal por endocannabinoides, la señalización mediada por receptores de glutamato y la LTD sináptica, entre otras (**Fig. 15** y **Tabla S6, Archivo Suplementario 2**). Estos datos se muestran de forma detallada en la **Tabla 8** para los diferentes grupos experimentales. De forma interesante, al comparar los resultados del análisis Z-score entre los diferentes grupos (**Tabla S7, Archivo Suplementario 2**), se observó que IPA predice un incremento de actividad de dichas vías en SNs Ts1Cje, pero no en Ts1Cje RAPA, lo que sugiere que el tratamiento con rapamicina normalizaría dichas funciones sinápticas.

#### 4.2. Análisis de la mGluR-LTD Gp I en el ratón Ts1Cje.

Como se acaba de indicar en la sección anterior, los resultados proteómicos obtenidos al analizar SNs de hipocampo de ratones Ts1Cje sugerían un incremento de actividad de vías de plasticidad sináptica relacionadas con la LTD. Nuestro grupo de investigación demostró hace años la hiperactivación de la vía mTOR en el ratón Ts1Cje (Troca-Marín et al., 2011). Esta vía está implicada en un tipo particular de LTD: la mGluR-LTD GpI. Por tanto, se decidió evaluar esta forma de plasticidad en el hipocampo de ratones Ts1Cje.

Para ello, se realizaron registros electrofisiológicos empleando un sistema MEA 3D. De este modo, se registró la actividad post-sináptica en la vía de las colaterales de Schaffer a su paso por la región *stratum radiatum* de la CA1 del hipocampo de ratones Ts1Cje y ratones silvestres jóvenes (P21-P30). La LTD dependiente de receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I (mGluR Gp I) se evaluó mediante la aplicación de DHPG, un agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I, a rodajas de hipocampo, a una concentración de 100  $\mu$ M durante 5 minutos (ver sección Materiales y Métodos).

**Tabla 7. Proteínas implicadas en rutas mitocondriales afectadas en SNs de hipocampo de ratones Ts1Cje.** Se muestran los niveles relativos de esas proteínas (en veces, comparados con SNs WT) en SNs Ts1Cje, Ts1Cje RAPA y WT RAPA.

<b>Símbolo</b>	<b>Gen</b>	<b>ID</b>	<b>Ts1Cje</b>	<b>Ts1Cje RAPA</b>	<b>WT RAPA</b>	<b>Ruta canónica IPA</b>
APP	amyloid beta precursor protein	P12023	1.246	1.025	1.109	Mitochondrial dysfunction Sirtuin signaling
ATP5MF	ATP synthase membrane subunit f	P56135	1.925	1.265	1.189	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation
ATP5PD	ATP synthase peripheral stalk subunit d	Q9DCX2	1.523	-1.002	1.057	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation
ATP5PF	ATP synthase peripheral stalk subunit F6	P97450	1.907	1.066	1.239	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
COX4I1	cytochrome c oxidase subunit 4I1	P19783	1.818	-1.014	1.121	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation
COX5A	cytochrome c oxidase subunit 5A	P12787	1.889	-1.085	1.003	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation
Cox6c	cytochrome c oxidase subunit 6C	Q9CPQ1	2.119	-1.146	1.006	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation
CYC1	cytochrome c1	Q9D0M3	1.728	-1.079	-1.011	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
CYCS	cytochrome c. somatic	P62897	1.976	1.928	1.814	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation
GPD2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2	Q64521	1.549	-1.070	1.056	Mitochondrial dysfunction
MAOB	monoamine oxidase B	Q8BW75	1.235	-1.071	-1.051	Mitochondrial dysfunction
MT-CO2	cytochrome c oxidase subunit II	P00405	2.804	-1.022	1.149	Mitochondrial dysfunction

NDUFA2	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A2	Q9CQ75	1.337	-1.023	-1.045	Oxidative phosphorylation Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
NDUFA4	NDUFA4 mitochondrial complex associated	Q62425	1.331	1.081	1.199	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
NDUFA8	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A8	Q9DCJ5	1.546	-1.069	-1.091	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
NDUFAF1	NADH:ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 1	A2AQ17	1.359	1.317	1.188	Mitochondrial dysfunction Sirtuin signaling
NDUFS1	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S1	Q91VD9	1.813	1.013	1.093	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
NDUFS3	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S3	Q9DCT2	1.713	-1.035	1.075	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
NDUFS6	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit S6	P52503	1.368	-1.021	-1.030	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
NDUFV2	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit V2	Q9D6J6	1.487	1.064	1.120	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
SLC25A4	solute carrier family 25 member 4	P48962	1.591	-1.006	1.075	Sirtuin signaling
UQCRCB	ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	Q9CQB4	1.928	1.051	1.098	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation

UQCRC1	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1	Q9CZ13	1.687	-1.021	1.106	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation
UQCRFS1	ubiquinol-cytochrome c reductase. Rieske iron-sulfur polypeptide 1	Q9CR68	3.192	-1.049	1.157	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
UQCRQ	ubiquinol-cytochrome c reductase complex III subunit VII	Q9CQ69	2.522	1.085	1.193	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation
VDAC1	voltage dependent anion channel 1	Q60932	1.762	-1.175	-1.016	Mitochondrial dysfunction Sirtuin signaling
VDAC2	voltage dependent anion channel 2	Q60930	2.043	-1.022	1.041	Mitochondrial dysfunction Sirtuin signaling
WRN	Werner syndrome RecQ like helicase	O09053	-1.341	-1.060	1.100	Sirtuin signaling



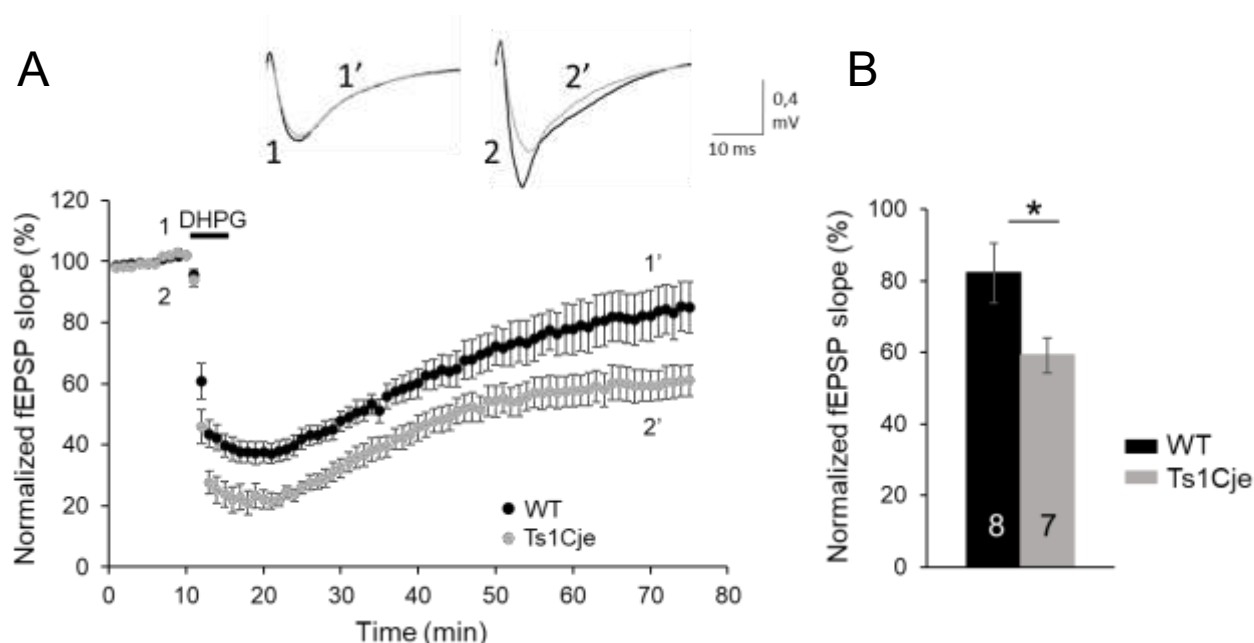
**Tabla 8. Proteínas implicadas en rutas de plasticidad sináptica afectadas en SNs de hipocampo de ratones Ts1Cje.** Se muestran los niveles relativos de esas proteínas (en veces, comparados con SNs WT) en SNs Ts1Cje, Ts1Cje RAPA y WT RAPA.

<b>Símbolo</b>	<b>Gen</b>	<b>ID</b>	<b>Ts1Cje</b>	<b>Ts1Cje RAPA</b>	<b>WT RAPA</b>	<b>Ruta canónica IPA</b>
ADCY9	adenylate cyclase 9	P51830	1.344	1.080	1.210	CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse
ATP2A2	ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> transporting 2	O55143	1.251	-1.033	1.004	Calcium signaling
ATP2B1	ATPase plasma membrane Ca <sup>2+</sup> transporting 1	G5E829	1.329	-1.077	1.029	Calcium signaling
ATP2B2	ATPase plasma membrane Ca <sup>2+</sup> transporting 2	F8WHB1	1.268	1.017	1.043	Calcium signaling
CACNA1A	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A	P97445	1.314	1.117	-1.007	Calcium signaling CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse Synaptic LTD
CACNA1G	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 G	Q5SUF8	1.474	-1.164	-1.029	Calcium signaling CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse Synaptic LTD
CACNA2D1	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 1	O08532	1.262	-1.117	-1.034	Calcium signaling CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse Synaptic LTD
GNB2	G protein subunit beta 2	E9QKR0	1.207	-1.033	1.092	CREB signaling
GNG2	G protein subunit gamma 2	P63213	-1.212	-1.319	-1.404	CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse Glutamate receptor signaling

GRIA2	glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2	P23819	1.481	1.132	1.173	Calcium signaling CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse Glutamate receptor signaling Synaptic LTD
GRIA4	glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4	Q9Z2W8	-1.251	-1.142	-1.170	Calcium signaling CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse Glutamate receptor signaling Synaptic LTD
GRIN1	glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1	A2AI21	1.758	1.050	1.129	Calcium signaling CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse Glutamate receptor signaling
GRIN2B	glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B	Q01097	1.371	1.031	-1.030	Calcium signaling CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse Glutamate receptor signaling
GRM5	glutamate metabotropic receptor 5	Q3UVX5	1.200	1.012	-1.045	CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse Glutamate receptor signaling Synaptic LTD
RAP2B	RAP2B, member of RAS oncogene family	P61226	1.300	1.029	1.144	Calcium signaling CREB signaling Synaptic LTD
RYR2	ryanodine receptor 2	E9Q401	1.251	1.043	-1.045	Calcium signaling Synaptic LTD

Como resultado de este tratamiento, se observó una drástica reducción del fEPSP tras los 5 min de tratamiento con DHPG (**Fig. 18**), siendo de mayor magnitud en el caso Ts1Cje que en los ratones silvestres (Ts1Cje: 21,96% +/-4,16%; WT: 38,69% +/-3,95% de la línea base). Por otra parte, se observó el establecimiento de una LTD, al menos durante 1 hora tras el inicio del tratamiento, que fue mayor en los ratones Ts1Cje que en los ratones silvestres (Ts1Cje: 59,12% +/-4,92%; WT: 82,12% +/-8,31% de la línea base, a los 60 min tras la aplicación de DHPG).

De estos resultados se puede concluir que la mGluR-LTD en la región CA1 del hipocampo está incrementada en los ratones Ts1Cje.



**Figura 18. mGluR-LTD en rodajas de hipocampo WT y Ts1Cje.** (A) Curso temporal de los efectos del DHPG sobre los potenciales post-sinápticos excitatorios de campo (fEPSP) en ratones WT y Ts1Cje. En la parte superior se muestran registros representativos de un fEPSP antes (1,2) y después (1', 2') de la aplicación del DHPG en ratones WT (1, 1') y en ratones Ts1Cje (2, 2'). (B) Cuantificación de los efectos mostrados en el panel A. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Se indica el número de rodajas analizadas para cada condición, en la barra correspondiente (WT: 8 rodajas obtenidas de 4 ratones; Ts1Cje: 7 rodajas obtenidas de 3 ratones). P = 0,039 (t-test de Student).

#### 4.3. Análisis de la densidad y morfología de espinas dendríticas en el hipocampo del ratón Ts1Cje y efecto de la rapamicina.

Estudios previos demuestran una relación entre la mGluR-LTD y la contracción y eliminación de espinas dendríticas (Zhou et al., 2004; Ramiro-Cortés and Israely, 2013).

Por otra parte, se han descrito alteraciones de las espinas dendríticas en distintos modelos murinos de SD, incluido el ratón Ts1Cje, así como en muestras *post-mortem* de personas con SD (Benavides-Piccione et al., 2004; Belichenko et al., 2004; 2007). Por ello, mediante tinción de Golgi, se decidió verificar la densidad de las espinas dendríticas en el hipocampo del ratón Ts1Cje, así como evaluar el efecto de la rapamicina, administrada prenatalmente, en la densidad de espinas dendríticas.

Como se indicó en el apartado Materiales y Métodos, se administró una única inyección intraperitoneal de rapamicina a hembras gestantes entre los días E15 y E17, y se analizaron las dendritas secundarias de neuronas piramidales de la región *stratum radiatum* de la CA1 del hipocampo de su progenie a día P18. Como control se utilizaron ratones WT y Ts1Cje P18 nacidos de hembras que no habían sido tratadas con rapamicina.

Al analizar los resultados de la tinción de Golgi, se observó una reducción de la densidad de espinas dendríticas en el ratón Ts1Cje respecto al silvestre (Ts1Cje: 0,523 +/- 0,035 espinas/ $\mu$ m, n = 26; WT: 0,640 +/- 0,031 espinas/ $\mu$ m, n = 50; P = 0,015, t-test de Student). Sin embargo, en ratones Ts1Cje tratados prenatalmente con rapamicina no se observaron cambios estadísticamente significativos que permitieran determinar un efecto de la rapamicina sobre este aspecto de la morfología de las neuronas, ni en ratones trisómicos ni en silvestres (Ts1Cje RAPA: 0,572 +/- 0,021 espinas/ $\mu$ m, n = 31; WT RAPA: 0,666 +/- 0,029 espinas/ $\mu$ m, n = 27).

Considerando la relación, ya descrita, entre el tamaño de las espinas y la susceptibilidad a la LTD dependiente de mGluR, que asocia espinas de gran tamaño que contienen retículo endoplásmico con esta forma específica de plasticidad (Holbro et al., 2009), se decidió analizar las características morfológicas de las espinas presentes en las dendritas secundarias de la región *stratum radiatum* de la CA1 del hipocampo.

Para ello se llevó a cabo una caracterización cualitativa de la morfología estableciendo tres tipos de espina en base a su forma: “*mushroom*”, “*stubby*” y filopodios. Las espinas *mushroom* son de mediana longitud, presentan una cabeza de mayor tamaño que su cuello, y constituyen el grupo de las espinas maduras. Las espinas “*stubby*” son de longitud corta-mediana, con una cabeza de un tamaño similar al cuello. Estas espinas presentan actividad eléctrica y morfología intermedia entre “*mushroom*” y filopodio. Por último, los filopodios son espinas inmaduras, por lo general de mayor longitud que los

otros dos tipos, y más delgadas, con un diámetro uniforme en su recorrido no pudiéndose definir una cabeza de la espina en este caso.

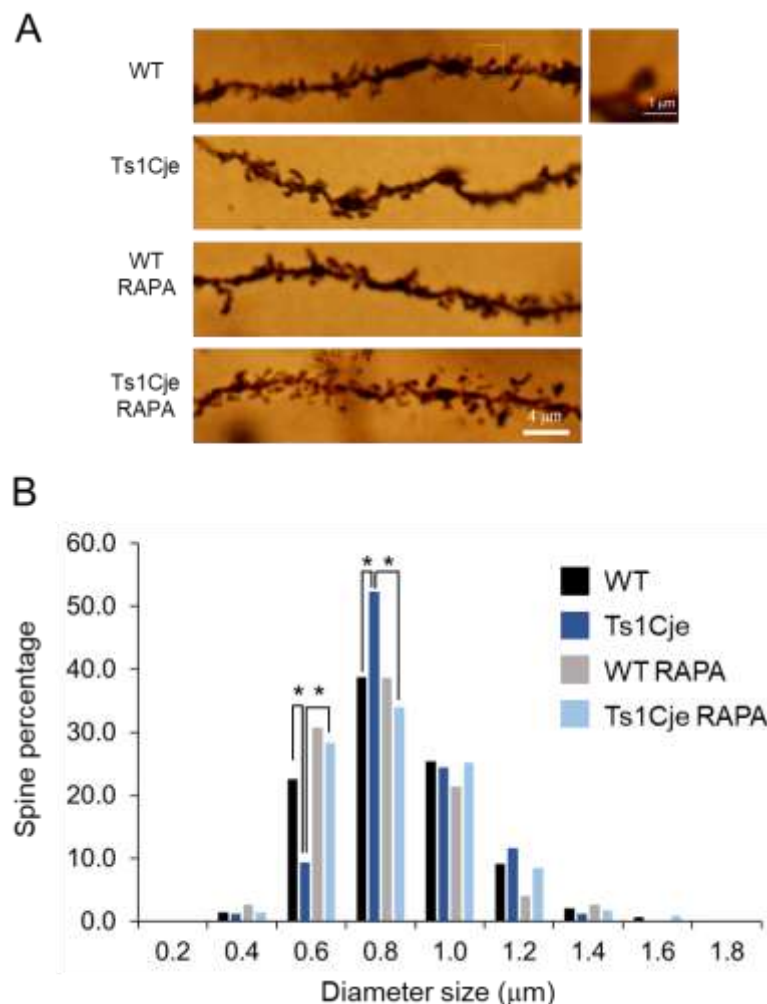
Como se muestra en la **Tabla 9**, no se observaron diferencias significativas en la proporción de los distintos tipos de espinas entre el ratón Ts1Cje y el silvestre. Sin embargo, en los ratones tratados prenatalmente con rapamicina se observó una tendencia hacia un incremento en la proporción de espinas inmaduras (filopodios) para ambos genotipos (**Tabla 9**), con un valor  $P = 0,0629$  al comparar WT vs. WT RAPA, y  $P = 0,0672$  en la comparación de Ts1Cje vs. Ts1Cje RAPA (test *Z-score* con dos colas).

**Tabla 9. Comparación de los porcentajes de filopodios, espinas *stubby* y *mushroom* en las dendritas secundarias de neuronas de la región apical del *stratum radiatum* en ratones WT y Ts1Cje sin tratar y tratados prenatalmente con rapamicina (RAPA).** El número de ratones usados por condición fue 2, excepto en el caso WT RAPA (un único animal). El número total (n) de espinas analizadas en cada grupo experimental se indica entre paréntesis.

Morfología de las espinas	WT (n = 248)	Ts1Cje (n = 151)	WT RAPA (n = 143)	Ts1Cje RAPA (n= 635)
Filopodios	14.9	13.2	22.4	19.7
<i>Stubby</i>	27.8	29.8	25.2	26.5
<i>Mushroom</i>	57.3	57.0	52.4	53.9

Puesto que las espinas susceptibles de sufrir mGluR-LTD se caracterizan por tener mayor diámetro (Holbro et al., 2009), se llevó a cabo una determinación del diámetro de la cabeza de las espinas de tipo “*mushroom*”. Al representar la distribución por tamaño, se observaron evidentes variaciones entre espinas Ts1Cje y silvestres. Como se muestra en la **Fig. 19**, la proporción de espinas “*mushroom*” de diámetro 0,5-0,7  $\mu\text{m}$  era menor en el ratón Ts1Cje que en el ratón WT (Ts1Cje: 9,3%; WT: 22,5%;  $P = 0,011$ , Z-test para la comparación de proporciones entre dos poblaciones), mientras que en el rango 0,7-0,9  $\mu\text{m}$ , el ratón Ts1Cje presentaba un porcentaje de espinas mayor que el WT (Ts1Cje: 52,3%; WT: 38,7%;  $P = 0,045$ , Z-test).

De manera interesante, se observó que en ratones Ts1Cje tratados prenatalmente con rapamicina (Ts1Cje RAPA), la distribución de espinas tipo “*mushroom*” atendiendo al criterio de diámetro de la cabeza de la espina era similar a la distribución WT (**Fig. 19**), y de hecho, al comparar los porcentajes de espinas “*mushroom*” de diámetro 0,5-0,7  $\mu\text{m}$  y 0,7-0,9  $\mu\text{m}$  entre ratones Ts1Cje RAPA y Ts1Cje, se obtuvieron valores estadísticamente significativos (diámetro 0,5-0,7  $\mu\text{m}$ : Ts1Cje RAPA = 28,4%; Ts1Cje = 9,3%;  $P = 0,001$ , Z-test; diámetro 0,7-0,9  $\mu\text{m}$ : Ts1Cje RAPA = 33,9%; Ts1Cje = 52,3%;  $P = 0,002$ , Z-test). Estos resultados sugieren que el tratamiento prenatal con rapamicina restaura la morfología de este tipo de espinas dendríticas en los ratones Ts1Cje.



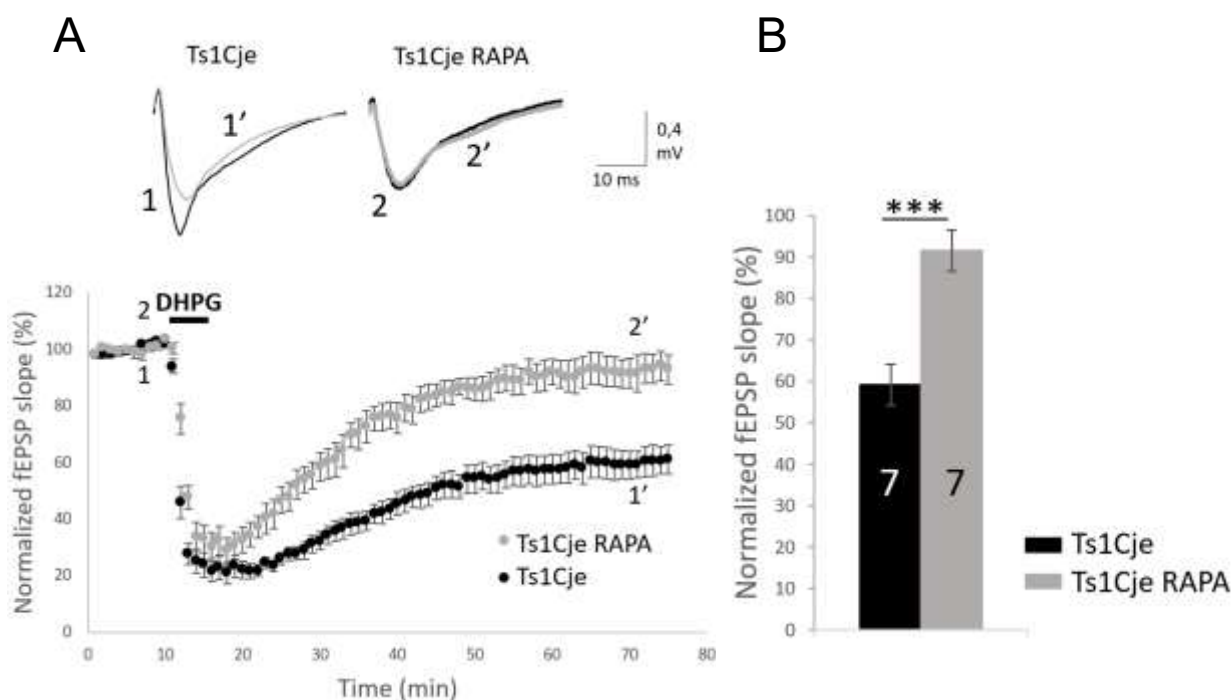
**Figura 19. Distribución del porcentaje de espinas “*mushroom*” agrupadas por diámetro de la cabeza en ratones WT y Ts1Cje sin tratar, o tratados prenatalmente con rapamicina (RAPA). (A) Imágenes representativas de la tinción de Golgi para cada grupo experimental; se muestra una ampliación de una espina de tipo “*mushroom*”. (B) Distribución de las espinas**

“mushroom” agrupadas por diámetro de la cabeza. El centro del primer y último *bin* en el histograma se fijó automáticamente por el programa estadístico empleado (GraphPad Prism), y se estableció una anchura de *bin* de 0,2  $\mu\text{m}$ . Se indican con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.4. Análisis de la mGluR-LTD Gp I en el ratón Ts1Cje tratado prenatalmente con rapamicina.

Puesto que el tratamiento prenatal con rapamicina normalizó la distribución de tamaños de espinas “mushroom” en los ratones Ts1Cje, se procedió a evaluar el efecto de dicho tratamiento en la mGluR-LTD Gp I. Para ello se administró intraperitonealmente una única inyección de rapamicina a hembras gestantes (véase Materiales y Métodos) y se caracterizó la actividad electrofisiológica de la región *stratum radiatum* de la CA1 en las crías a P21-P30.

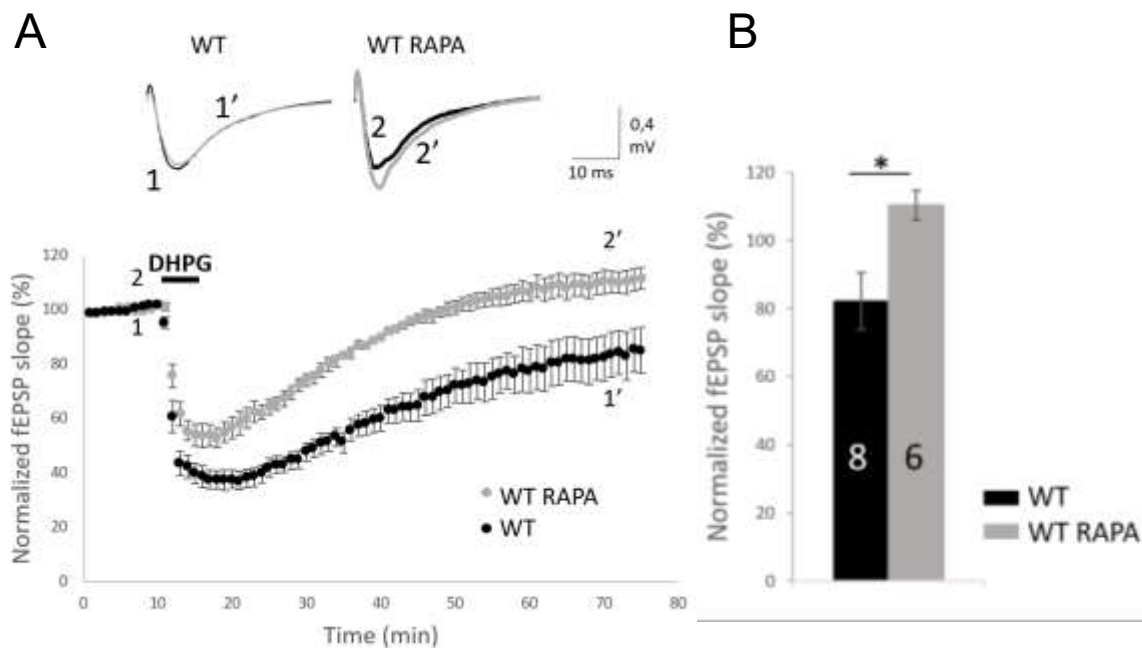
Como se observa en la **Fig. 20** este tratamiento redujo la LTD exagerada del ratón Ts1Cje, pasando a mostrar valores próximos al WT (91,55%  $\pm$  5,23% de la línea base, a los 60 min de la aplicación de DHPG).



**Figura 20. mGluR-LTD en rodajas de hipocampo de ratón Ts1Cje tratado prenatalmente con rapamicina.** (A) Curso temporal de los efectos del DHPG sobre los potenciales post-sinápticos excitatorios de campo (fEPSP) en ratones Ts1Cje tratados con rapamicina (Ts1Cje RAPA) y Ts1Cje control (mismos datos que la **Fig. 16**). En la parte superior se muestran registros representativos de un fEPSP antes (1,2) y después (1', 2') de la aplicación del DHPG en ratones

Ts1Cje (1, 1'; mismos datos que la **Fig. 16**) y en ratones Ts1Cje RAPA (2, 2'). **(B)** Cuantificación de los efectos mostrados en el panel A. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Se indica el número de rodajas analizadas para cada condición, en la barra correspondiente (Ts1Cje: 7 rodajas obtenidas de 3 ratones; Ts1Cje RAPA: 7 rodajas obtenidas de 4 ratones).  $P < 0,001$  (t-test de Student).

En el caso de ratones WT tratados prenatalmente con rapamicina de forma similar, se observó que la mGluR-LTD quedaba abolida (**Fig. 20**), mostrando un valor  $110,35\% \pm 4,32\%$  de la línea base a los 60 min de la aplicación de DHPG.

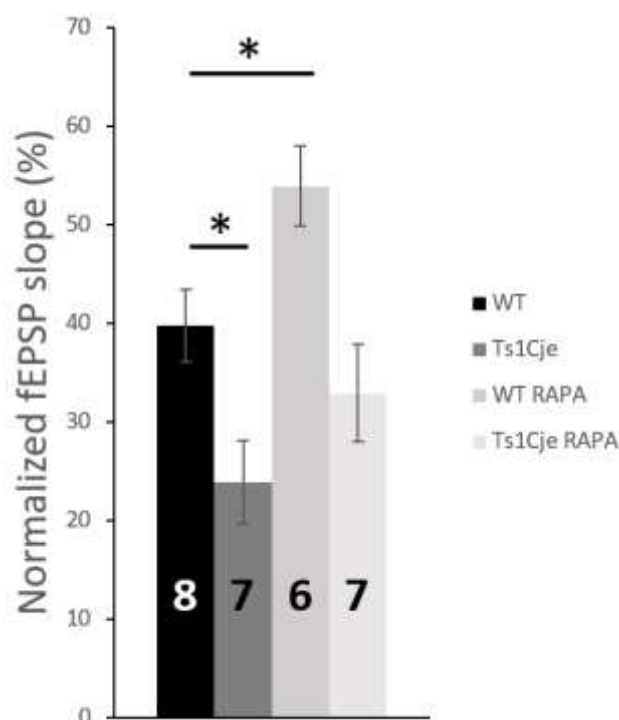


**Figura 21. mGluR-LTD en rodajas de hipocampo de ratón silvestre tratado prenatalmente con rapamicina.** **(A)** Curso temporal de los efectos del DHPG sobre los fEPSP en ratones silvestres tratados con rapamicina (WT RAPA) y silvestres controles (WT; mismos datos que la **Fig. 16**). En la parte superior se muestran registros representativos de un fEPSP antes (1,2) y después (1', 2') de la aplicación del DHPG en ratones silvestres (1, 1'; mismos datos que la **Fig. 16**) y en ratones silvestres tratados con rapamicina (2, 2'). **(B)** Cuantificación de los efectos mostrados en el panel A. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Se indica el número de rodajas analizadas para cada condición, en la barra correspondiente (WT: 8 rodajas obtenidas de 4 ratones; WT RAPA: 6 rodajas obtenidas de 3 ratones).  $P < 0,05$  (t-test de Student).

De forma interesante, al comparar los resultados obtenidos en los cuatro grupos experimentales (**Fig. 22**) se observó que la rapamicina no tenía un efecto importante sobre la depresión del fEPSP observada justo tras la aplicación de DHPG (medido a los 5 min de su aplicación) en los ratones trisómicos. Por tanto, se pudo concluir que, aunque la rapamicina tiene un efecto restaurador sobre la mGluR-LTD en los ratones Ts1Cje



(medida a los 60 min de la aplicación de DHPG), no recupera la depresión inicial exagerada del fEPSP.



**Figura 22. Efecto del DHPG en el fEPSP tras 5 minutos de aplicación del tratamiento.** Valores de la pendiente de la curva inicial del fEPSP medidos a los 5 minutos del inicio del tratamiento con DHPG, normalizados con respecto al valor medio de la línea base (100%), para los ratones WT (32,94%), Ts1Cje (23,87%), silvestres tratados con rapamicina (53,95%) y ratones Ts1Cje tratados con rapamicina (32,94%). Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).  $P < 0,05$  (t-test de Student).

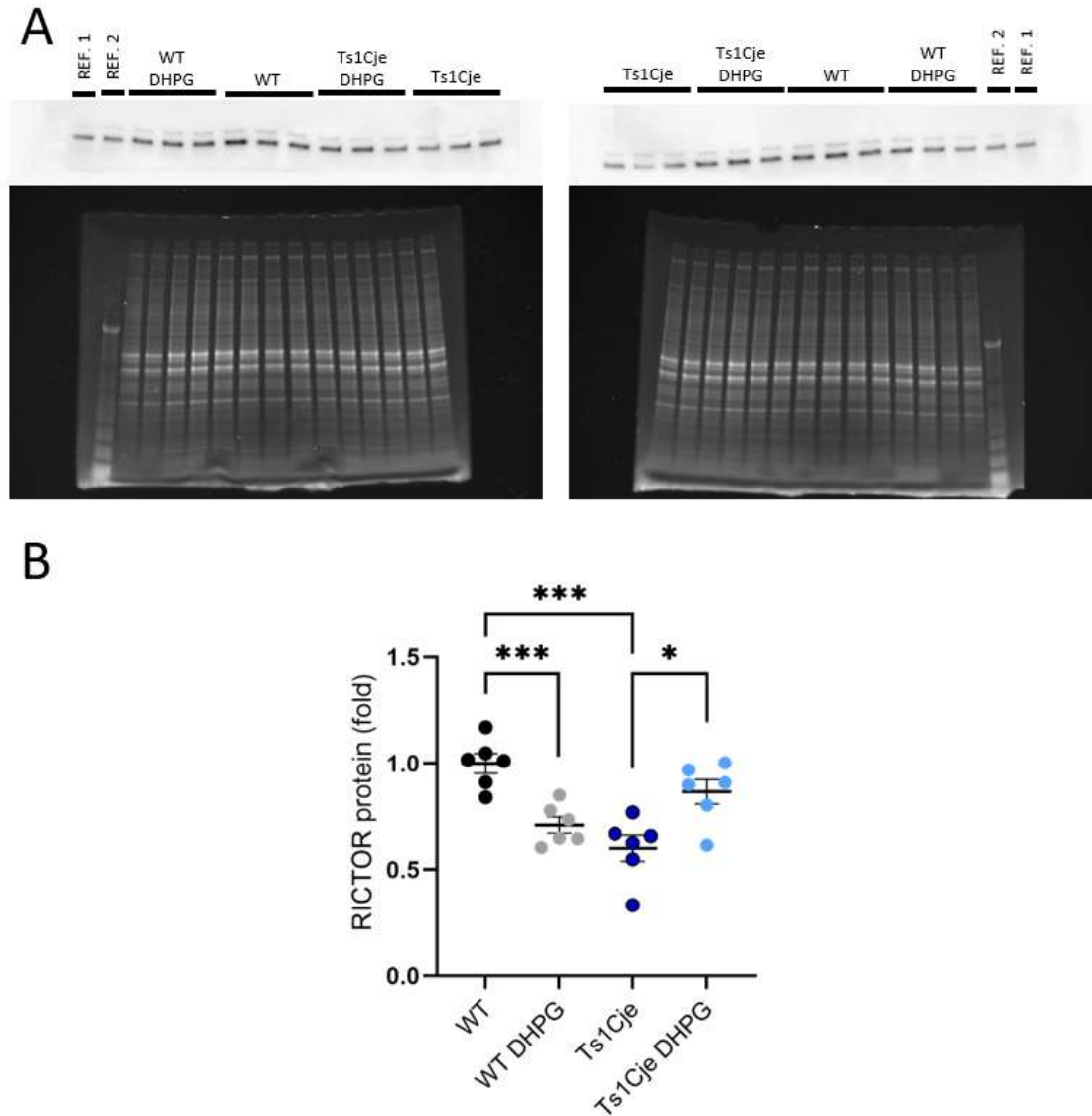
#### 4.5. Evaluación de los niveles de mTORC2 en el hipocampo de ratones Ts1Cje.

Dada la relevancia del complejo mTORC2 en la mGluR-LTD Gp I (Zhu et al., 2018), se decidió evaluar los niveles basales de este complejo en el hipocampo de ratones Ts1Cje, así como el efecto de la aplicación de DHPG.

Para ello se cuantificaron los niveles de RICTOR (*Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin*), una proteína exclusiva del complejo mTORC2, mediante WB en rodajas de hipocampo WT o Ts1Cje (P21-P30), tratadas o no con DHPG 100 $\mu$ M durante 5 min. En este último caso, la expresión de RICTOR se evaluó tras 60 min desde la aplicación del DHPG.

Los resultados obtenidos (**Fig. 23**) permitieron concluir que los niveles basales de RICTOR estaban reducidos en el ratón Ts1Cje respecto al silvestre, pero se incrementaban al tratar con DHPG, mientras que ocurría lo contrario en el WT, es decir,

el tratamiento con DHPG producía una reducción de los niveles de RICTOR en este caso. Estos resultados apuntan hacia una alteración de la regulación del complejo mTORC2 en los ratones trisómicos.



**Figura 23. Cuantificación de la proteína RICTOR en el hipocampo de ratones WT y Ts1Cje con y sin tratamiento de DHPG.** (A) WBs de las muestras de ratones WT y Ts1Cje hermanos de camada analizados, y proteína total cargada. Para normalizar los valores de ambos WBs se tomaron dos muestras de referencia (REF. 1 y REF. 2). (B) Cuantificación de los resultados mostrados en el panel A. Las señales de RICTOR se normalizaron en base a la proteína total correspondiente cargada en el gel, y se indica la media ± SEM (WT: 1,3954 ± 0,065; WT DHPG: 0,9905 ± 0,0536; Ts1Cje: 0,8381 ± 0,0849; Ts1Cje DHPG: 1,2092 ± 0,0801).  $P < 0,05$  (t-test de Student).

## **5. DISCUSIÓN**

## 5. Discusión.

### *5.1. Alteraciones del proteoma sináptico en el hipocampo del ratón Ts1Cje adulto. Efecto de la rapamicina.*

En este trabajo se ha caracterizado el proteoma sináptico del hipocampo de ratones Ts1Cje adultos, lo que ha permitido identificar varias rutas de señalización alteradas que podrían explicar, al menos en parte, los déficits de plasticidad y memoria/aprendizaje previamente descritos en este modelo de SD (Sago et al., 1998; Siarey et al., 2005; Belichenko et al., 2007; Andrade-Talavera et al., 2015). Así, dos funciones principales emergen como alteradas en el hipocampo Ts1Cje: la función mitocondrial y la plasticidad sináptica (incluyendo la LTD). De forma interesante, los niveles sinápticos de las proteínas que pertenecen a esas rutas afectadas se normalizaron tras el tratamiento con rapamicina inyectada intraperitonealmente durante cinco días, lo que apoya fuertemente el posible beneficio del tratamiento con rapamicina en el contexto del SD.

Respecto a la función mitocondrial, se ha descrito previamente su alteración en el cerebro del ratón Ts1Cje, así como un incremento de estrés oxidativo (Shukkur et al., 2006). De hecho, la afectación de la función mitocondrial en el SD se conoce desde hace mucho tiempo (revisado por Valenti et al., 2014; 2018; Izzo et al., 2018). Más recientemente (Bordi et al., 2019) se ha descrito la acumulación de mitocondrias dañadas en fibroblastos de pacientes con SD, en correlación con un incremento de estrés oxidativo, hiperactivación de mTOR y reducción de los procesos de mitofagia y autofagia. El papel de mTORC1 como regulador de la inducción de autofagia y mitofagia en respuesta al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa está bien establecido (Bartolomé et al., 2017). En consonancia, la inhibición farmacológica de mTOR con AZD8055, que inhibe tanto a mTORC1 como a mTORC2 (Chresta et al., 2010), restaura la autofagia y la mitofagia en los fibroblastos de pacientes con SD (Bordi et al., 2019). Como ya se ha mencionado, nuestro laboratorio demostró la hiperactivación de mTOR en el hipocampo del ratón Ts1Cje (Troca-Marín et al., 2011). En consonancia con dicha hiperactivación, en esta Tesis se encontró una reducción de la autofagia, evidenciada por una reducción de la relación LC3B-II/LC3B-I (**Fig. 16**). Dicha reducción podría estar relacionada con la disfunción mitocondrial detectada en el análisis proteómico de SNs Ts1Cje, y con los niveles incrementados del marcador de masa mitocondrial TOM20 medidos en el hipocampo Ts1Cje adulto (**Fig. 17**).

También merece la pena destacar la posible relación entre la disfunción mitocondrial y el sistema endocannabinoide, que también aparece como desregulado en el estudio proteómico realizado (**Fig. 15**). Si bien existe cierta controversia en la aceptación de que las mitocondrias presenten receptores cannabinoideos asociados, se ha observado que los compuestos cannabinoideos modulan la actividad mitocondrial (Di Marzo et al., 2015), por lo que la alteración de la señalización endocannabinoide podría también afectar a la actividad mitocondrial.

Finalmente, en el contexto del tratamiento con rapamicina y su capacidad para restablecer la función mitocondrial a nivel proteómico, resulta interesante considerar también al complejo 2 de mTOR (mTORC2), ya que también ha sido asociado a la regulación de la actividad mitocondrial (Betz et al., 2013) y puede ser inhibido por la rapamicina en determinadas condiciones (Zhu et al., 2018; Schreiber et al., 2015).

Respecto a la plasticidad sináptica, los datos proteómicos apuntan a una mayor actividad de la señalización por calcio, por la vía CREB, por endocannabinoideos y por receptores de glutamato, así como una mayor actividad de la LTD sináptica.

En este sentido, resulta interesante la expresión elevada de GRIN1 y GRIN2B. Estos genes codifican para las subunidades NR1 (GRIN1) y NR2B (GRIN2B) de los receptores de NMDA. Estas subunidades se agregan formando heterodímeros que constituyen el NMDAR y definen su afinidad por ligando y su cinética (Vicini et al., 1998; Rauner y Köhr, 2011; Erreger et al., 2005). Se ha descrito que la desactivación de los receptores NR1/NR2B es más lenta que la de los NR1/NR2A (Vicini et al., 1998). Además, los NMDAR compuestos por NR1/NR2A son más sensibles a breves pulsos de glutamato y tienen una mayor probabilidad de apertura que los NR1/NR2B (Erreger et al., 2005). En base a estas características, Erreger y colaboradores establecieron mediante simulación, que, ante una estimulación de baja frecuencia (LFS, 1Hz), los heterodímeros NR1/NR2B contribuyen a la entrada de calcio en mayor medida que los NR1/NR2A y viceversa ante una estimulación de alta frecuencia (HFS, 100Hz) (Erreger et al., 2005). Es también sabido que la estimulación de baja frecuencia (LFS) se ha vinculado a diversas formas de LTD (Kemp et al., 2000; Lüscher y Malenka, 2012; Volianskis et al., 2015), mientras que la estimulación de alta frecuencia (HFS) se asocia con la inducción de LTP (Bliss y Collingridge, 1993; Lüscher y Malenka, 2012; Volianskis et al., 2015). Algunos autores establecieron una relación entre las subunidades NR2B y NR2A con la LTD y

LTP, respectivamente, en hipocampo (Liu et al., 2004; Kim et al., 2005) y corteza perirrinal (Massey et al., 2004). No obstante, este planteamiento ha sido debatido y reformulado (Berberich et al., 2007; Morishita et al., 2007; Kash y Winder, 2007; Gardoni et al., 2009; Park et al., 2014; Wang et al., 2016b), sugiriendo que es la relación entre los niveles de NR2A/NR2B lo que define la susceptibilidad de una sinapsis a las diferentes formas de plasticidad (Morishita et al., 2007; Yashiro y Philpot, 2008). Por otra parte, estos aspectos podrían variar durante el desarrollo (Pérez-Otaño y Ehlers, 2004; Kim et al., 2005; Cui et al., 2013), ser dependientes del protocolo de inducción empleado (Berberich et al., 2007; Cui et al., 2013) y variar durante el progreso de la forma de plasticidad estudiada (Park et al., 2014). Considerando todo esto, el incremento en los niveles de NR2B observado en los SNs del ratón Ts1Cje, podría estar asociado a una desregulación del tráfico de los NR2B y tener consecuencias a nivel electrofisiológico en la LTP y la LTD dependientes de NMDARs. En este sentido, Siarey y colaboradores ya describieron un incremento en la LTD inducida por LFS en el hipocampo del ratón Ts1Cje, así como una reducción en la HFS-LTP (Siarey et al., 2005). Este resultado resulta contradictorio con lo observado por Tang y colaboradores (Tang et al., 1999), quienes describen que la sobreexpresión de NR2B en ratones transgénicos para el gen de esta proteína, induce un incremento en la HFS-LTP en el hipocampo mientras que la LFS-LTD no se ve afectada. No obstante, es preciso tener en cuenta que, como se ha mencionado previamente, diversos factores pueden influir en la relación entre la ratio NR2A/NR2B y la plasticidad sináptica (Berberich et al., 2007; Cui et al., 2013; Park et al., 2014).

Por otra parte, se ha descrito que la activación por BDNF de los receptores TrkB postsinápticos induce la fosforilación de las subunidades de los NMDAR lo que incrementa su probabilidad de apertura, potenciando la señalización mediada por NMDAR (Levine et al., 1998). De forma peculiar, esta potenciación de los NMDAR se da solo en aquellos que contienen la subunidad NR2B (Levine y Kolb, 2000). Además, se ha observado que la estimulación con BDNF produce un incremento de la expresión de NR2B y su presencia en la membrana sináptica de neuronas del hipocampo (Caldeira et al., 2007; Afonso et al., 2019). Considerando por tanto la sobreexpresión de BDNF descrita previamente por nuestro grupo en el hipocampo del ratón Ts1Cje (Troca-Marín et al., 2011), el aumento de los niveles sinápticos de NR2B podría explicarse por el incremento de los niveles de BDNF.

Los cambios proteómicos observados en SULT4A1 (Sulfotransferasa 4A1) y LIN7A (Lin-7 homolog A) también podrían ser relevantes en este contexto. SULT4A1 es una proteína implicada en la regulación de la ramificación dendrítica, la densidad de espinas y la morfología de la espina. Se ha descrito que niveles reducidos de SULT4A1 en neuronas corticales producen una reducción en los niveles de NR1 en la sinapsis y en su reclutamiento a la membrana del terminal postsináptico (Culotta et al., 2020). Considerando esta relación, los niveles elevados de SULT4A1 observados en los SNs de hipocampo del ratón Ts1Cje, podrían estar vinculados a los niveles elevados observados para NR1. LIN7A, también conocido como MALS1 o VELI1, es una proteína que, entre otras funciones, está implicada en la formación de un complejo de transporte vesicular dendrítico de las subunidades NR2B (Butz et al., 1998; Jo et al 1999; Setou et al., 2000). NR2B interacciona con LIN7A, que a su vez se ancla a Mint1/X11 $\alpha$  y CASK para unirse a KIF17 (proteína que se asocia a microtúbulos y permite el transporte vesicular), y es transportado a la región postsináptica (Setou et al., 2000). Los niveles reducidos de LIN7A, observados en este trabajo, podrían estar relacionados con una reducción del complejo de transporte vesicular de NR2B y, a su vez, esto podría conllevar una reducción de subunidades NR2B asociadas a vesículas de transporte. En este sentido y considerando los niveles elevados de NR2B observados en los SNs del Ts1Cje, es tentador sugerir que los niveles reducidos de LIN7A podrían estar asociados a una mayor presencia de NR2B en la membrana del terminal postsináptico.

En los resultados proteómicos, se observan niveles desregulados de otras proteínas relacionadas con los NMDAR, como SRC (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src). Esta proteína está implicada en la fosforilación de los NMDAR, lo que incrementa la probabilidad de apertura del canal (Ali y Salter, 2001), concretamente en los residuos de tirosina de la subunidad NR2A (Köhr y Seeburg, 1996). Además, SRC participa en la LTP asociada a NMDAR en la sinapsis del hipocampo, probablemente mediando la actividad de los NMDAR (Lu et al., 1998).

Otra proteína implicada en la regulación de los receptores de glutamato en la sinapsis es la fodrina, también conocida como espectrina- $\alpha$ II no eritrocítica (SPTAN1). Esta proteína se ancla a las membranas celulares y a proteínas de membrana, e interacciona con la actina para conferir estabilidad estructural a la espina (Harris y Marrow, 1990; Ethell y Pasquale, 2005; Lambert, 2018). Se ha descrito que la proteólisis de la fodrina, mediada por CaM y calpaina (dependiente de Ca<sup>++</sup>), incrementa la

disponibilidad de receptores de glutamato en el terminal postsináptico (Siman et al., 1985), incluyendo los NMDAR (Wechsler y Teichberg, 1998), y se ha vinculado al inicio de la LTP en neuronas de hipocampo (Lynch y Baudry, 1984). Considerando esto, los niveles reducidos de fodrina observados en los SNs del ratón Ts1Cje podrían estar asociados a un estado basal potenciado de la sinapsis, y a la mayor presencia de NMDARs en los SNs de este ratón modelo. Además, dada su vinculación con la regulación del citoesqueleto, también podría estar implicada en las alteraciones de la morfología de las espinas descritas en esta Tesis Doctoral.

En los siguientes apartados se abordarán los resultados proteómicos en el contexto del incremento de la mGluR-LTD y la alteración de la morfología de espinas en el hipocampo del ratón Ts1Cje.

## 5.2. Alteraciones de la mGluR-LTD en el hipocampo del ratón Ts1Cje.

Los resultados mostrados en este trabajo ponen de evidencia un incremento de la LTD inducida mediante DHPG en la sinapsis de las fibras colaterales de Schaffer con las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo del ratón Ts1Cje. Si bien esta forma de plasticidad no parece estar alterada en el modelo más ampliamente estudiado de SD, el ratón Ts65Dn (Scott-Mckean y Costa, 2011), existen diferencias importantes a nivel genómico entre dicho modelo y el ratón Ts1Cje que podrían explicar esta aparente contradicción. Así, los ratones Ts65Dn presentan en trisomía una región adicional del MMU16 que no es ortóloga al HSA21, por lo que dicho modelo contiene genes adicionales en trisomía que no están relacionados con el SD (Duchon et al., 2011). Por otra parte, el estudio de Scott-Mckean y Costa (Scott-Mckean y Costa, 2011) utiliza animales en un rango de edad (6-8 meses) muy diferente al empleado en este trabajo (P21-30). Puesto que los mecanismos moleculares y celulares de la mGluR-LTD parecen estar muy regulados durante el desarrollo (**Tabla 3**) (Moult et al., 2008), esta diferencia de edad podría ser especialmente importante a la hora de explicar las discrepancias observadas.

Considerando la relación establecida entre la LTD y algunos *test* de comportamiento como son el reconocimiento espacial de objetos y el reconocimiento de objetos nuevos (Goh et al, 2013; Lüscher and Huber, 2010), la alteración de la mGluR-LTD Gp I en el hipocampo del ratón Ts1Cje que hemos demostrado podría ser relevante



en relación a lo observado en un estudio previo de nuestro laboratorio, en el que se detectó un déficit en el reconocimiento de objetos nuevos en los ratones Ts1Cje (Dra. Itziar Benito, datos sin publicar).

En cuanto a los mecanismos moleculares que podrían ser responsables del fenotipo observado, como se indicó en la Introducción, FMRP es especialmente importante para la mGluR-LTD. Así, en ratones *knockout* del gen *FMRI*, que codifica FMRP y sirven como modelo del síndrome del X Frágil, se ha descrito previamente un incremento de la mGluR-LTD (Huber et al., 2002) similar al encontrado en el hipocampo Ts1Cje en esta Tesis Doctoral. Paradójicamente nuestro grupo detectó un ligero aumento en los niveles de proteína FMRP en dendritas de neuronas de hipocampo en cultivo (analizado por inmunofluorescencia) y en muestras de hipocampo (analizadas mediante WB) de los ratones Ts1Cje (resultados obtenidos por el Dr. Juan José Casañas). Por tanto, el mecanismo implicado en este caso debe ser diferente. En ese sentido, resulta especialmente relevante el aumento de los niveles del receptor mGluR5 (indicado como GRM5 en la **Tabla 4**), que está directamente asociado a esta forma de plasticidad, y cuya expresión también se ha observado incrementada en la corteza cerebral de personas con síndrome de Down (Oka y Takashima 1999).

El análisis proteómico también predice un incremento en la vía de señalización por calcio que (aunque con cierta controversia) ha sido asociada a la actividad de los mGluR Gp I (Chakroborty et al., 2012; Kumar y Foster, 2007; Holbro et al., 2009). En este contexto es de particular interés el aumento de los niveles del receptor de rianodina 2 (RyR2) observado en SNs Ts1Cje. Los RyR2 son canales de calcio particularmente abundantes en el aparato de la espina (Sharp et al., 1993), una especialización del retículo endoplásmico (ER) formada por discos membranosos apilados, con un papel importante en traducción local y señalización por calcio (Jedlicka et al., 2008; Segal y Korkotian, 2014). Se ha descrito que la inhibición de RyR2 produce que el tratamiento con DHPG induzca potenciación de la sinapsis en lugar de depresión (Chakroborty et al., 2012), lo cual sugiere un importante papel de estos receptores en la depresión asociada a la activación de los mGluR Gp I, así como la participación de los reservorios intracelulares de calcio en esta forma de plasticidad. En relación a los niveles elevados de RYR2 observados en el análisis proteómico, se ha descrito que el BDNF induce la expresión de RYR2 en el hipocampo y que este receptor es necesario para el agrandamiento de las espinas dendríticas inducido por BDNF (Adasme et al., 2011). Como se ha mencionado

previamente, nuestro grupo describió niveles elevados de BDNF en el hipocampo del ratón Ts1Cje (Troca-Marín et al., 2011), lo que podría estar relacionado con el incremento de los niveles de RYR2 y con la alteración en el tamaño de las espinas observados en el ratón Ts1Cje.

Otra proteína que puede resultar de interés en relación con los RYR2 es FKBP1B. Esta proteína presenta niveles reducidos en los SNs del ratón Ts1Cje. Se ha descrito que FKBP1B, también llamado FKBP12.6 o calstabin2, interacciona con los RYR2 en estado cerrado y los estabiliza, por lo que actúa como bloqueador de estos canales, inhibiendo la liberación del  $Ca^{++}$  al citosol (Liu et al., 2012; Gant et al., 2011). Niveles reducidos de FKBP1B podrían, por tanto, favorecer la liberación de  $Ca^{++}$  al citosol, contribuyendo al incremento de la mGluR-LTD. Además, la ausencia de FKBP1B se ha asociado con un aumento de la expresión de mTOR y RYR2 en el hipocampo (Gant et al., 2011). Resulta interesante que la rapamicina se una a FKBP1B y lo desplace de los RYR2 incrementando la liberación de  $Ca^{++}$  desde el aparato de la espina (Gant et al., 2011). En este sentido, los niveles reducidos de FKBP1B podrían estar asociados a los niveles elevados de RYR2 observados en los SNs del ratón Ts1Cje. De manera peculiar, rapamicina normaliza los niveles de RYR2, aunque mantiene reducidos los niveles de FKBP1B.

En la mGluR-LTD Gp I, la depresión de la respuesta sináptica está asociada a una reducción de receptores AMPA en la sinapsis. No obstante, en algunas áreas del cerebro esta depresión está asociada al intercambio de los receptores de AMPA de alta conductancia al calcio, que no contienen la subunidad GluA2, por receptores de AMPA que contienen la subunidad GluA2, lo que confiere una conductancia al calcio reducida (Pick and Ziff, 2018). En este sentido, resulta interesante el incremento de GluA2 identificado en el análisis proteómico de SNs Ts1Cje (**Tabla 4**). Además, se ha demostrado un papel de RyR2 en el tráfico de la subunidad GluA2 desde el ER a la membrana sináptica, en un proceso dependiente de calcio (Pick et al., 2017). De igual modo, RAP2B también se ha descrito que participa en la endocitosis de los AMPAR a través de JNK (Zhu et al., 2002; Zhu et al., 2005), y contribuye a la depresión sináptica (Zhang et al., 2018). Ambas, RYR2 y RAP2B, presentan niveles elevados en los SNs del ratón Ts1Cje y se normalizan al ser tratados con rapamicina.

No obstante, conviene tener en cuenta que el análisis proteómico realizado en este trabajo de Tesis Doctoral se llevó a cabo a partir de SNs procedentes de animales adultos, mientras que los estudios electrofisiológicos se realizaron en rodajas de hipocampo de animales P21-P30, por lo que las correlaciones indicadas deben tomarse con la debida precaución.

### 5.3. Alteraciones de la morfología de las espinas dendríticas en el hipocampo del ratón Ts1Cje.

En el análisis de la morfología de las espinas dendríticas se observó una distribución anómala del tamaño de las espinas de tipo “*mushroom*” en el hipocampo Ts1Cje, consistente en una mayor proporción de espinas de diámetro comprendido entre 0,7 y 0,9  $\mu\text{m}$ . Se ha descrito una correlación entre espinas de mayor tamaño y la presencia de ER y aparato de la espina (Spacek, 1985; Edwards, 1995; Spacek y Harris 1997; Holbro et al., 2009), y de hecho se ha demostrado que las espinas susceptibles de sufrir mGluR-LTD en la región CA1 del hipocampo constituyen una subpoblación de espinas con cabeza grande que contiene ER y aparato de la espina, mientras que las espinas sin ER son refractarias a la mGluR-LTD (Holbro et al., 2009). Por tanto, resulta tentador proponer que el desequilibrio observado en el hipocampo Ts1Cje hacia espinas de mayor tamaño esté vinculado al incremento de la mGluR-LTD. Si esta hipótesis fuera cierta, los niveles aumentados observados en el análisis proteómico de RyR2 y SERCA2, que son proteínas asociadas al ER y al aparato de la espina (Sharp et al., 1993; Majewska et al., 2000; Sabatini et al., 2002; Segal y Korkotian, 2014), así como de otras proteínas implicadas en la señalización por calcio (GluA2, GluA4, GluN1, GluN2B y  $\text{Ca}^{++}$  ATPasas) y de otros receptores glutamatérgicos relevantes para la mGluR-LTD, como mGluR5, podrían ser una consecuencia de la mayor proporción de espinas tipo “*mushroom*” de gran tamaño, que contienen ER y aparato de la espina (**Fig. 24**). En relación a este incremento de las espinas de mayor tamaño, resulta interesante la desregulación del BDNF descrita en el ratón Ts1Cje por nuestro grupo (Troca-Marín et al., 2011). Como se ha mencionado previamente en relación a los RYR2, el BDNF produce agrandamiento de la espina dendrítica en un proceso dependiente de traducción de proteínas (Tanaka et al., 2008; Adasme et al., 2011). Por tanto, la sobreexpresión de BDNF descrita en el ratón Ts1Cje podría estar relacionada con el incremento en el tamaño

de las espinas que se describe en esta Tesis Doctoral. En este sentido, resultan también interesantes los niveles desregulados de proteínas como PFN2, Marcks o DOCK3 observados en los SNs de hipocampo del ratón Ts1Cje. Profilina-II (PFN2) se expresa fundamentalmente en el cerebro (Witke et al., 2001). Esta proteína juega un papel en la polimerización de actina y en la estabilización de los filamentos de actina (Ethell y Pasquale, 2005). En neuronas de hipocampo, la acumulación de Profilina-II es inducida por la activación de los NMDAR y produce la estabilización de la morfología de la espina madura (Ackermann y Matus, 2003). El mantenimiento de esta acumulación de profilina-II es dependiente del incremento de  $Ca^{++}$  a nivel postsináptico. En la amígdala, se ha descrito que los niveles elevados de profilina-II están asociados a espinas con densidades postsinápticas más grandes (Lamprecht et al., 2006). En este sentido, y considerando la relación de los niveles de profilina con el estado madurativo de la espina, los niveles elevados de PFN2 observados en los SNs de hipocampo del ratón Ts1Cje, podrían estar asociados al incremento en la proporción de espinas de mayor tamaño observado en este ratón. En este mismo sentido, los niveles reducidos de Marcks observados en el análisis proteómico también podrían estar vinculados a la alteración de la morfología de la espina. Esta proteína actúa como un represor de la polimerización de la actina y su acción es revertida cuando es fosforilada por PKC y CaM (Arbuzova et al., 2002), por lo que su reducción favorecería la polimerización de la actina y, en consecuencia, el incremento del tamaño de la espina (Bramham, 2008). De forma similar, los niveles elevados de DOCK3 (también denominado MOCA o Presenilin Binding Protein) que se han observado en los SNs del ratón Ts1Cje, podrían estar asociados a este fenotipo de la espina dendrítica. DOCK3, entre otras funciones, activa Rac1 (Namekata et al., 2004) que contribuye a la polimerización de la actina (Bosco et al., 2009) y regula la morfología dendrítica y de la espina (Nakayama et al., 2000; Wiens et al., 2005; Ethell y Pasquale 2005; Bai et al., 2015). De forma interesante, el tratamiento con rapamicina normaliza los niveles de PFN2, Marcks y DOCK3 en los SNs del ratón Ts1Cje y restaura la alteración morfológica de las espinas dendríticas.

Finalmente, otra proteína de interés es la catenina alfa 2 (CTNNA2). La mutación de CTNNA2 induce la alteración de las espinas dendríticas en neuronas de hipocampo (Togashi et al., 2002) y se ha descrito que la sobreexpresión de esta proteína provoca un incremento en el tamaño de la cabeza de la espina (Abe et al., 2004), por lo que el

incremento de los niveles de CTNNA2 observado en SNs Ts1Cje (**Tabla 4**) podría ser relevante para el fenotipo dendrítico.

En cualquier caso, como ya se ha indicado, los datos proteómicos corresponden a animales de diferente edad que los utilizados en el análisis morfológico de espinas. Además, los tratamientos de rapamicina llevados a cabo para cada experimento son diferentes.

Por otra parte, en la región CA1 del hipocampo Ts1Cje también se observó una disminución de la densidad de espinas dendríticas. Un estudio realizado por Belichenko y colaboradores (Belinchenko et al., 2007) mostró que, si bien la densidad de espinas estaba disminuida en este modelo de SD en la región del giro dentado, no se observaban diferencias con el ratón silvestre en la región CA1. No obstante, el rango de edad incluido en dicho estudio fue de 9 a 10 meses. Estudios preliminares realizados en el contexto de esta Tesis Doctoral utilizando ratones de 2,5 meses (datos no mostrados) tampoco mostraron diferencias de densidad de espinas en la CA1 de ratones Ts1Cje, comparando con los silvestres. Por tanto, el fenotipo de reducción de densidad de espinas observado a P18 sería transitorio.

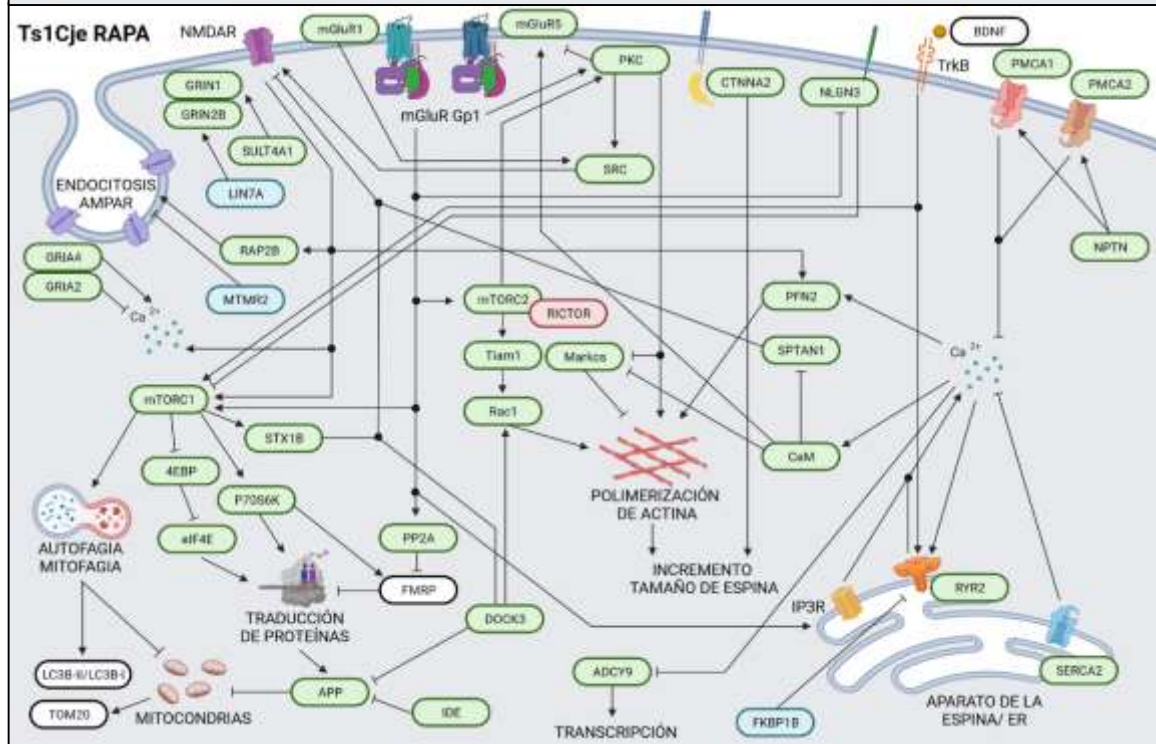
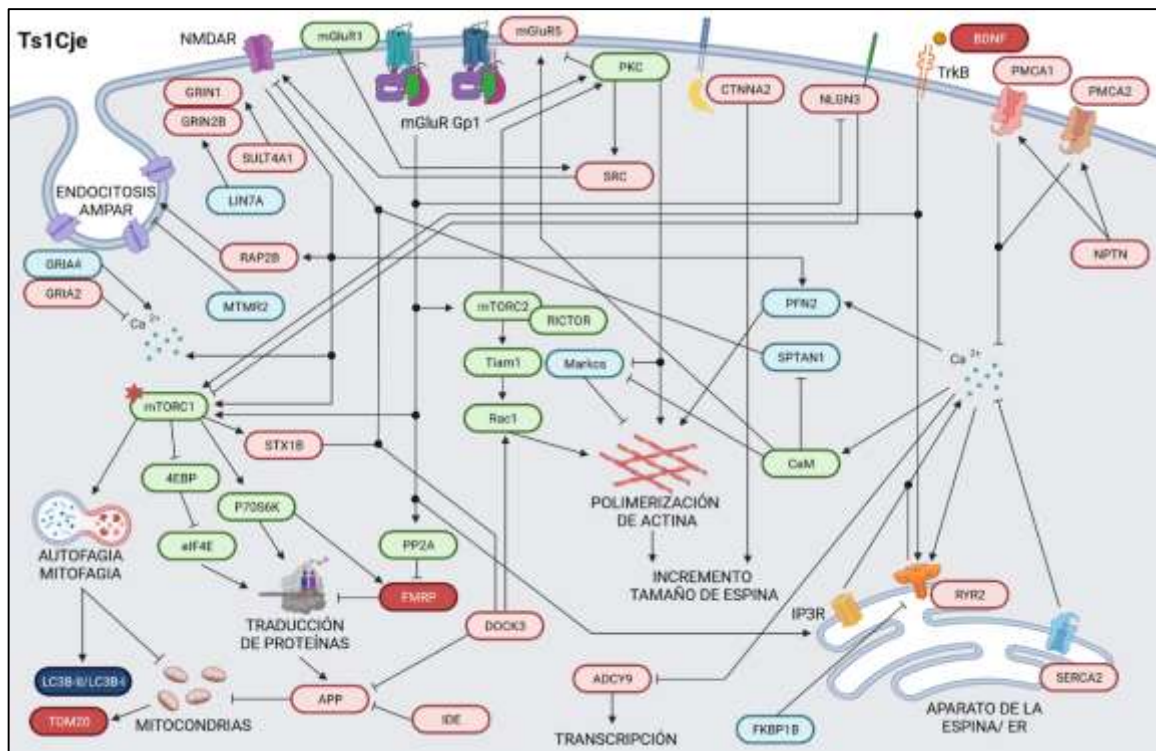
Está bien establecido que, durante el desarrollo postnatal, se da un proceso conocido como poda sináptica, que consiste en una eliminación masiva de espinas sinápticas. Durante esta etapa del desarrollo se produce un balance entre los procesos de espinogénesis y eliminación de espinas que podría estar relacionado con la consolidación de las sinapsis maduras (Yuste, 2010). En los roedores, este proceso de poda sináptica se produce en los primeros meses de vida (Yuste, 2010; Nimchinsky et al., 2002; Jawaid et al., 2018; Afroz et al., 2016). Considerando la diferencia observada en la densidad de espinas según la edad de estudio y el rango de edad asociado al proceso de poda sináptico en roedores, resulta tentador asociar el decremento de la densidad de espinas en el hipocampo Ts1Cje a una posible alteración del proceso de poda sináptica que, aunque aparentemente no implica alteraciones a nivel de número de espinas en el individuo adulto, podría afectar a la selección de dichas espinas.

#### 5.4. Efecto del tratamiento prenatal con rapamicina.

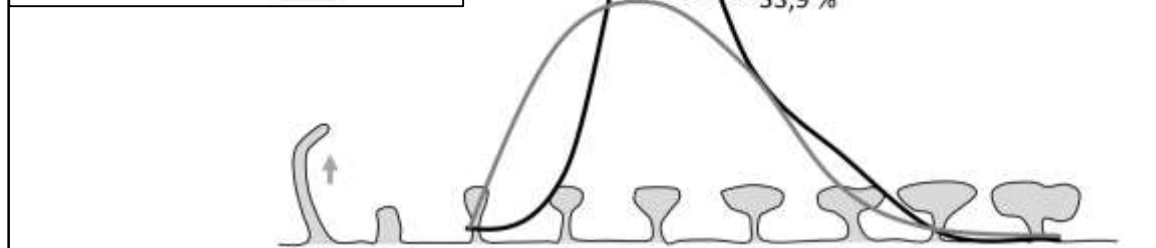
En este trabajo hemos demostrado que el tratamiento prenatal con rapamicina restaura la mGluR-LTD (**Fig. 20**) y normaliza la distribución por tamaño de las espinas tipo “mushroom” en el ratón Ts1Cje (**Fig. 19**). Estos dos fenotipos podrían estar relacionados, ya que la subpoblación de espinas “*mushroom*” de mayor diámetro (entre 0,7 y 0,9  $\mu\text{m}$ , cuyo porcentaje se encuentra incrementado en el hipocampo Ts1Cje) podría corresponder a la población de espinas que contribuyen a la depresión inducida por DHPG. El efecto corrector de la rapamicina sobre la morfología de las espinas podría deberse tanto a la inhibición de mTORC1 como a la inhibición de mTORC2. Como ya se ha indicado, mTORC1 participa en la regulación de la autofagia, proceso que se ha vinculado a la morfología y fisiología sinápticas y a la eliminación de espinas (Shehata et al 2012; Tang et al., 2014). Por otra parte, mTORC2 regula el citoesqueleto y está directamente relacionado con la modulación de la estructura de la sinapsis (Costa-Mattioli y Monteggia, 2013). En esta línea es interesante considerar que, en muestras de hipocampo total (ratones de edad p-21-30), se detectaron niveles basales reducidos de RICTOR en el ratón Ts1Cje (**Fig. 23**). Como ya se ha indicado RICTOR es un componente exclusivo de mTORC2 y regula además a la proteína Tiam1, que también está vinculada al remodelado del citoesqueleto (Costa-Mattioli y Monteggia, 2013). En este contexto también resulta interesante mencionar que el gen Tiam1 se localiza en el HSA21 y está en trisomía en el ratón Ts1Cje. Por otra parte, los niveles de RICTOR parecen estar sometidos a regulación por activación de receptores mGluR1/5. Así, el tratamiento con DHPG de rodajas de hipocampo silvestres produjo una reducción de los niveles de RICTOR, mientras que se observó lo contrario, es decir, un incremento, en el caso Ts1Cje (**Fig. 23**). Esto sugiere una alteración importante de la regulación de mTORC2 en el modelo Ts1Cje. Experimentos futuros permitirán establecer si el tratamiento prenatal con rapamicina tiene un efecto restaurador sobre dicha regulación.

Por otra parte, a pesar de que el tratamiento prenatal con rapamicina normaliza la mGluR-LTD en el hipocampo Ts1Cje, es importante destacar que no recupera la depresión inicial exagerada del fEPSP inducida tras el tratamiento de DHPG (**Fig. 22**). Algunos autores responsabilizan a los receptores mGluR1 de esta depresión aguda inicial (Hou y Klann, 2004) y también se ha relacionado con el sistema endocannabinoide (Rouach y Nicoll, 2003). Así, la inhibición selectiva de los receptores mGluR1 implica la reducción de la depresión aguda tras el tratamiento con DHPG, mientras que los mGluR5

parecen contribuir de manera exclusiva a la fase tardía de la mGluR-LTD Gp I (Hou y Klann, 2004). Por otra parte, la activación de los mGluRs se ha vinculado al sistema endocannabinoide por la producción de 2-AG (*2-arachidonoylglycerol*) mediada por PLC $\beta$  (*Phospholipase C $\beta$* ) y DGL $\alpha$  (*diacylglycerol lipase*). De manera general, se considera que la señalización endocannabinoide es retrograda, ya que el 2-AG se une a los receptores cannabinoide en el terminal presináptico y regula la liberación de neurotransmisor. No obstante, algunos estudios sugieren que el sistema endocannabinoide también ejerce modulación a nivel postsináptico mediante la activación de receptores TRPV1 (*vanilloid receptor type 1*) y CB1R (*cannabinoid type-1 receptor*) presentes en el terminal postsináptico, así como en los astrocitos, que modulan la actividad de los terminales pre- y postsinápticos (Castillo et al., 2012). Aunque CB1R es el principal receptor al que se asocia esta actividad endocannabinoide (Castillo et al., 2012), la depresión aguda producida tras el tratamiento con DHPG no es dependiente de su activación, lo que sugiere la participación de otro receptor presente en la sinapsis excitatoria (Rouach y Nicoll, 2003). Las predicciones IPA en base a los resultados proteómicos indican una mayor actividad del sistema de señalización endocannabinoide en SNs Ts1Cje (**Tabla 8** y **Tabla S7**, Archivo suplementario 2), lo que podría explicar la depresión aguda inicial exagerada del fEPSP en el hipocampo Ts1Cje.



Proteómica SIs Ts1Cje	WB hipocampo Ts1Cje
<span style="background-color: #f8d7da; border: 1px solid #c0392b; border-radius: 5px; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> Sobreexpresión	<span style="background-color: #e74c3c; border: 1px solid #c0392b; border-radius: 5px; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> Sobreexpresión
<span style="background-color: #d1ecf1; border: 1px solid #c0392b; border-radius: 5px; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> Infraexpresión	<span style="background-color: #34495e; border: 1px solid #c0392b; border-radius: 5px; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> Infraexpresión
<span style="background-color: #d4edda; border: 1px solid #c0392b; border-radius: 5px; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> No afectado	<span style="border: 1px solid #c0392b; border-radius: 5px; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> Sin datos
	<span style="color: red; font-weight: bold;">*</span> Hiperactivado





**Figura 24. Alteraciones de la morfología sináptica y a nivel de proteínas en la sinapsis del hipocampo del ratón Ts1Cje y efecto del tratamiento con rapamicina.** El ratón Ts1Cje presenta una alteración en la morfología de las espinas dendríticas en la CA1 del hipocampo, con un desplazamiento de la curva de distribución hacia espinas de mayor tamaño (parte inferior de la figura). En el hipocampo, las espinas de mayor tamaño presentan aparato de la espina y son las únicas susceptibles de mGluR-LTD (Spacek, 1985; Edwards, 1995; Spacek y Harris 1997; Holbro et al., 2009). En el análisis proteómico se han observado alteradas proteínas implicadas en la regulación de la mGluR-LTD. El ratón Ts1Cje presenta niveles elevados de mGluR5, implicado en la mGluR-LTD. También presenta un incremento en los niveles de RYR2 y de SERCA2, proteínas implicadas en la regulación del Ca<sup>++</sup>, que se localizan en el retículo endoplasmático/aparato de la espina (Sharp et al., 1993; Majewska et al., 2000; Sabatini et al., 2002; Segal y Korkotian, 2014). Otras proteínas implicadas en plasticidad y en la regulación del calcio son las subunidades de los NMDAR, GRIN1 (NR1) y GRIN2B (NR2B) que favorecen la entrada de Ca<sup>++</sup> al terminal postsináptico (Pérez-Otaño y Ehlers, 2004). De manera contraria, el incremento en los niveles de GRIA2, PMCA1 y PMCA2; así como el decremento en los niveles de GRIA4 contribuyen en la reducción de los niveles de Ca<sup>++</sup> intracelular (Jonas y Burnashev 1995; Burette et al., 2010; Kenyon et al., 2010). También se observan desreguladas MTMR2 y RAP2B, que son proteínas implicadas en la endocitosis de los AMPAR (Zhu et al., 2002; Zhu et al., 2005; Lee et al., 2010); y SULT4A1, LIN7A, SPTAN1, SRC, DOCK3 y STX1B que participan en la regulación de los NMDAR (Köhr y Seeburg, 1996; Wechsler y Teichberg, 1998; Jo et al., 1999; Setou et al 2000; Ali y Salter, 2001; Benquet et al 2002; Namekata et al., 2013; Bai et al., 2013; Niere y Raab-Graham, 2017; Culotta et al., 2020). Otras proteínas desreguladas afectan a la polimerización de la actina y la morfología de la espina dendrítica, como son Marcks, PFN2 y CTNNA2 (Arbuzova et al., 2002; Togashi et al., 2002; Ackermann y Matus, 2003; Abe et al., 2004; Ethell y Pasquale, 2005). Creado con BioRender.com.



## **6. CONCLUSIONES**

## 6. Conclusiones.

1. El estudio proteómico realizado con SNs del ratón Ts1Cje mostró 116 proteínas desreguladas, 108 de las cuales se encontraron sobreexpresadas y 8 infraexpresadas en comparación con el ratón silvestre. En base a estos datos el análisis mediante IPA permite predecir una desregulación en las vías canónicas de disfunción mitocondrial, señalización de sirtuinas y fosforilación oxidativa, señalización por calcio, señalización mediada por CREB, señalización neuronal por endocannabinoides, señalización mediada por receptores de glutamato y LTD sinápticas, entre otras.
2. Los niveles sinápticos de proteínas implicadas en las rutas canónicas relacionadas con las mitocondrias fueron similares en los ratones tratados con rapamicina y en ratones silvestres, lo que sugiere que la rapamicina restaura el fenotipo mitocondrial.
3. El análisis mediante IPA no predijo alteración de las rutas relacionadas con plasticidad en los SNs de ratones Ts1Cje tratados con rapamicina, lo que sugiere que la rapamicina restaura esas funciones sinápticas.
4. El ratón Ts1Cje presenta niveles reducidos de LC3B-II/LC3B-I en el hipocampo en comparación con el ratón silvestre, lo que sugiere una reducción en la autofagia. Además, presenta niveles elevados de TOM20 en el hipocampo en comparación con el ratón silvestre, lo que sugiere un incremento en la masa mitocondrial que podría estar vinculado a dicha reducción de la mitofagia.
5. El ratón Ts1Cje presenta un incremento de la mGluR-LTD inducida por DHPG en la región CA1 del hipocampo en comparación con el ratón silvestre.
6. El ratón Ts1Cje presenta una menor densidad de espinas en dendritas secundarias de la región *stratum radiatum* de la CA1 del hipocampo. Este fenotipo no se recupera con el tratamiento prenatal de rapamicina.
7. El ratón Ts1Cje presenta una distribución de las poblaciones de espina tipo “*mushroom*”, “*stubby*” y filopodio en dendritas secundarias de la región *stratum radiatum* de la CA1 del hipocampo similar al ratón silvestre. El tratamiento prenatal con rapamicina produce un ligero incremento de la población de espinas tipo filopodio.
8. El ratón Ts1Cje presenta una reducción de la proporción de espinas tipo “*mushroom*” de diámetro 0,5-0,7  $\mu\text{m}$  y un incremento para el grupo de diámetro

0,7-0,9  $\mu\text{m}$  en comparación con el ratón silvestre en dendritas secundarias de la región *stratum radiatum* de la CA1 del hipocampo.

9. En ratones Ts1Cje el tratamiento prenatal con rapamicina reestablece la distribución normal de espinas tipo “*mushroom*” basada en la medida del diámetro de la cabeza de la espina en dendritas secundarias de la región *stratum radiatum* de la CA1 del hipocampo.
10. El tratamiento prenatal con rapamicina restaura la mGluR-LTD inducida por DHPG en la región CA1 del hipocampo del ratón Ts1Cje.
11. El ratón Ts1Cje presenta niveles basales reducidos de RICTOR en el hipocampo en comparación con el ratón silvestre.
12. La aplicación de DHPG induce un incremento en los niveles de RICTOR en rodajas de hipocampo del ratón Ts1Cje, de manera contraria a lo que ocurre en el ratón silvestre donde se produce una disminución.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**

## 7. Bibliografía.

1. Abe K, Chisaka O, Van Roy F, Takeichi M. Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by alpha N-catenin. *Nat Neurosci.* 2004;7(4):357-63.
2. Ackermann M, Matus A. Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nat Neurosci.* 2003;6(11):1194-200.
3. Adasme T, Haeger P, Paula-Lima AC, Espinoza I, Casas-Alarcón MM, Carrasco MA, et al. Involvement of ryanodine receptors in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(7):3029-34.
4. Afonso P, De Luca P, Carvalho RS, Cortes L, Pinheiro P, Oliveiros B, et al. BDNF increases synaptic NMDA receptor abundance by enhancing the local translation of Pyk2 in cultured hippocampal neurons. *Sci Signal.* 2019;12(586).
5. Afroz S, Parato J, Shen H, Smith SS. Synaptic pruning in the female hippocampus is triggered at puberty by extrasynaptic GABAA receptors on dendritic spines. *Elife.* 2016;5.
6. Ali DW, Salter MW. NMDA receptor regulation by Src kinase signalling in excitatory synaptic transmission and plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 2001;11(3):336-42.
7. Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res.* 2007;163:3-22.
8. Andersen, P. *The hippocampus book.* Oxford University Press. 2007.
9. Andrade-Talavera Y, Benito I, Casañas JJ, Rodríguez-Moreno A, Montesinos ML. Rapamycin restores BDNF-LTP and the persistence of long-term memory in a model of Down's syndrome. *Neurobiol Dis.* 2015;82:516-25.
10. Antar LN, Afroz R, Dictenberg JB, Carroll RC, Bassell GJ. Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J Neurosci.* 2004;24(11):2648-55.
11. Antar LN, Dictenberg JB, Plociniak M, Afroz R, Bassell GJ. Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. *Genes Brain Behav.* 2005;4(6):350-9.
12. Antonarakis SE. Down syndrome and the complexity of genome dosage imbalance. *Nat Rev Genet.* 2017;18(3):147-63.
13. Antonarakis SE, Adelsberger PA, Petersen MB, Binkert F, Schinzel AA. Analysis of DNA polymorphisms suggests that most de novo dup(21q) chromosomes in patients with Down syndrome are isochromosomes and not translocations. *Am J Hum Genet.* 1990;47(6):968-72.



14. Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet.* 2004;5(10):725-38.
15. Anwyl R. Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. *Neuropharmacology.* 2009;56(4):735-40.
16. Arbuzova A, Schmitz AA, Vergères G. Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *Biochem J.* 2002;362(Pt 1):1-12.
17. Asim A, Kumar A, Muthuswamy S, Jain S, Agarwal S. "Down syndrome: an insight of the disease". *J Biomed Sci.* 2015;22:41.
18. Atkins L, Bartsocas CS. Down's syndrome associated with two Robertsonian translocations, 45,XX,-15,-21, + t(15q21q) and 46,XX,-21, + t(21q21q). *J Med Genet.* 1974;11(3):306-9.
19. Bai N, Hayashi H, Aida T, Namekata K, Harada T, Mishina M, et al. Dock3 interaction with a glutamate-receptor NR2D subunit protects neurons from excitotoxicity. *Mol Brain.* 2013;6:22.
20. Bai Y, Xiang X, Liang C, Shi L. Regulating Rac in the nervous system: molecular function and disease implication of Rac GEFs and GAPs. *Biomed Res Int.* 2015;2015:632450.
21. Ballard C, Mobley W, Hardy J, Williams G, Corbett A. Dementia in Down's syndrome. *Lancet Neurol.* 2016;15(6):622-36.
22. Bandyopadhyay R, McCaskill C, Knox-Du Bois C, Zhou Y, Berend SA, Bijlsma E, et al. Mosaicism in a patient with Down syndrome reveals post-fertilization formation of a Robertsonian translocation and isochromosome. *Am J Med Genet A.* 2003;116A(2):159-63.
23. Bartolomé A, García-Aguilar A, Asahara SI, Kido Y, Guillén C, Pajvani UB, et al. MTORC1 Regulates both General Autophagy and Mitophagy Induction after Oxidative Phosphorylation Uncoupling. *Mol Cell Biol.* 2017;37(23).
24. Bashir ZI, Bortolotto ZA, Davies CH, Berretta N, Irving AJ, Seal AJ, et al. Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *Nature.* 1993;363(6427):347-50.
25. Bashir ZI, Jane DE, Sunter DC, Watkins JC, Collingridge GL. Metabotropic glutamate receptors contribute to the induction of long-term depression in the CA1 region of the hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 1993;239(1-3):265-6.
26. Bear MF, Malenka RC. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol.* 1994;4(3):389-99.
27. Beattie EC, Carroll RC, Yu X, Morishita W, Yasuda H, von Zastrow M, et al. Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat Neurosci.* 2000;3(12):1291-300.

28. Belichenko PV, Kleschevnikov AM, Salehi A, Epstein CJ, Mobley WC. Synaptic and cognitive abnormalities in mouse models of Down syndrome: exploring genotype-phenotype relationships. *J Comp Neurol.* 2007;504(4):329-45.
29. Belichenko PV, Masliah E, Kleschevnikov AM, Villar AJ, Epstein CJ, Salehi A, et al. Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of Down Syndrome. *J Comp Neurol.* 2004;480(3):281-98.
30. Bell M, Bartol T, Sejnowski T, Rangamani P. Dendritic spine geometry and spine apparatus organization govern the spatiotemporal dynamics of calcium. *J Gen Physiol.* 2019;151(8):1017-34.
31. Benavides-Piccione R, Ballesteros-Yáñez I, de Lagrán MM, Elston G, Estivill X, Fillat C, et al. On dendrites in Down syndrome and DS murine models: a spiny way to learn. *Prog Neurobiol.* 2004;74(2):111-26.
32. Benhaourech S, Drighil A, Hammiri AE. Congenital heart disease and Down syndrome: various aspects of a confirmed association. *Cardiovasc J Afr.* 2016;27(5):287-90.
33. Benquet P, Gee CE, Gerber U. Two distinct signaling pathways upregulate NMDA receptor responses via two distinct metabotropic glutamate receptor subtypes. *J Neurosci.* 2002;22(22):9679-86.
34. Berberich S, Jensen V, Hvalby Ø, Seeburg PH, Köhr G. The role of NMDAR subtypes and charge transfer during hippocampal LTP induction. *Neuropharmacology.* 2007;52(1):77-86.
35. Bergström S, Carr H, Petersson G, Stephansson O, Bonamy AK, Dahlström A, et al. Trends in Congenital Heart Defects in Infants With Down Syndrome. *Pediatrics.* 2016;138(1).
36. Best TK, Cramer NP, Chakrabarti L, Haydar TF, Galdzicki Z. Dysfunctional hippocampal inhibition in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Exp Neurol.* 2012;233(2):749-57.
37. Best TK, Siarey RJ, Galdzicki Z. Ts65Dn, a mouse model of Down syndrome, exhibits increased GABAB-induced potassium current. *J Neurophysiol.* 2007;97(1):892-900.
38. Betz C, Stracka D, Prescianotto-Baschong C, Frieden M, Demarex N, Hall MN. Feature Article: mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(31):12526-34.
39. Bhakar AL, Dölen G, Bear MF. The pathophysiology of fragile X (and what it teaches us about synapses). *Annu Rev Neurosci.* 2012;35:417-43.
40. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 1993;361(6407):31-9.

41. Bordi M, Darji S, Sato Y, Mellén M, Berg MJ, Kumar A, et al. mTOR hyperactivation in Down Syndrome underlies deficits in autophagy induction, autophagosome formation, and mitophagy. *Cell Death Dis.* 2019;10(8):563.
42. Bortolotto ZA, Collingridge GL. Evidence that a novel metabotropic glutamate receptor mediates the induction of long-term potentiation at CA1 synapses in the hippocampus. *Biochem Soc Trans.* 1999;27(2):170-4.
43. Bosco EE, Mulloy JC, Zheng Y. Rac1 GTPase: a "Rac" of all trades. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(3):370-4.
44. Bramham CR. Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Curr Opin Neurobiol.* 2008;18(5):524-31.
45. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature.* 1994;369(6483):756-8.
46. Bull MJ, Genetics tCo. Health Supervision for Children With Down Syndrome. *Pediatrics.* 2011;128(2):393-406.
47. Burette AC, Strehler EE, Weinberg RJ. A plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase isoform at the postsynaptic density. *Neuroscience.* 2010;169(3):987-93.
48. Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron.* 2002;35(4):625-41.
49. Butz S, Okamoto M, Südhof TC. A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. *Cell.* 1998;94(6):773-82.
50. Caldeira MV, Melo CV, Pereira DB, Carvalho RF, Carvalho AL, Duarte CB. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2007;35(2):208-19.
51. Carew TJ, Walters ET, Kandel ER. Associative learning in *Aplysia*: cellular correlates supporting a conditioned fear hypothesis. *Science.* 1981;211(4481):501-4.
52. Carlesimo GA, Marotta L, Vicari S. Long-term memory in mental retardation: evidence for a specific impairment in subjects with Down's syndrome. *Neuropsychologia.* 1997;35(1):71-9.
53. Castillo PE, Younts TJ, Chávez AE, Hashimoto Y. Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron.* 2012;76(1):70-81.
54. Ceman S, O'Donnell WT, Reed M, Patton S, Pohl J, Warren ST. Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Hum Mol Genet.* 2003;12(24):3295-305.
55. Chakrabarti L, Best TK, Cramer NP, Carney RS, Isaac JT, Galdzicki Z, et al. Olig1 and Olig2 triplication causes developmental brain defects in Down syndrome. *Nat Neurosci.* 2010;13(8):927-34.
56. Chakroborty S, Kim J, Schneider C, Jacobson C, Molgó J, Stutzmann GE. Early presynaptic and postsynaptic calcium signaling abnormalities mask underlying synaptic

depression in presymptomatic Alzheimer's disease mice. *J Neurosci.* 2012;32(24):8341-53.

57. Chapman RS, Hesketh LJ. Behavioral phenotype of individuals with Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2000;6(2):84-95.

58. Chevaleyre V, Castillo PE. Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron.* 2003;38(3):461-72.

59. Chresta CM, Davies BR, Hickson I, Harding T, Cosulich S, Critchlow SE, et al. AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res.* 2010;70(1):288-98.

60. Citri A, Malenka RC. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology.* 2008;33(1):18-41.

61. Collingridge GL, Isaac JT, Wang YT. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(12):952-62.

62. Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol.* 1983;334:33-46.

63. Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT. Long-term depression in the CNS. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11(7):459-73.

64. Costa AC, Grybko MJ. Deficits in hippocampal CA1 LTP induced by TBS but not HFS in the Ts65Dn mouse: a model of Down syndrome. *Neurosci Lett.* 2005;382(3):317-22.

65. Costa-Mattioli M, Monteggia LM. mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci.* 2013;16(11):1537-43.

66. Cui Z, Feng R, Jacobs S, Duan Y, Wang H, Cao X, et al. Increased NR2A:NR2B ratio compresses long-term depression range and constrains long-term memory. *Sci Rep.* 2013;3:1036.

67. Culotta L, Scalmani P, Vinci E, Terragni B, Sessa A, Broccoli V, et al. SULT4A1 Modulates Synaptic Development and Function by Promoting the Formation of PSD-95/NMDAR Complex. *J Neurosci.* 2020;40(37):7013-26.

68. Das I, Reeves RH. The use of mouse models to understand and improve cognitive deficits in Down syndrome. *Dis Model Mech.* 2011;4(5):596-606.

69. David, G., Barrett, E. Short-term plasticity: Facilitation, augmentation, potentiation, and depression. In M. Selzer, S. Clarke, L. Cohen, G. Kwakkel, & R. Miller (Eds.), *Textbook of Neural Repair and Rehabilitation* (pp. 36-49). Cambridge: Cambridge University Press. 2014.

70. Davis S, Butcher SP, Morris RG. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral

concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J Neurosci.* 1992;12(1):21-34.

71. Davisson MT, Schmidt C, Akeson EC. Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome. *Prog Clin Biol Res.* 1990; 360:263-80.

72. Dennis SH, Pasqui F, Colvin EM, Sanger H, Mogg AJ, Felder CC, et al. Activation of Muscarinic M1 Acetylcholine Receptors Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Cereb Cortex.* 2016;26(1):414-26.

73. Devenny DA, Krinsky-McHale SJ, Sersen G, Silverman WP. Sequence of cognitive decline in dementia in adults with Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res.* 2000;44 ( Pt 6):654-65.

74. Di Marzo V, Stella N, Zimmer A. Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(1):30-42.

75. Dickinson BA, Jo J, Seok H, Son GH, Whitcomb DJ, Davies CH, et al. A novel mechanism of hippocampal LTD involving muscarinic receptor-triggered interactions between AMPARs, GRIP and liprin-alpha. *Mol Brain.* 2009;2:18.

76. Down JLH. Observations on an ethnic classification of idiots. *London Hospital Reports.* 1866;3:259-262.

77. Duchon A, Raveau M, Chevalier C, Nalesso V, Sharp AJ, Herault Y. Identification of the translocation breakpoints in the Ts65Dn and Ts1Cje mouse lines: relevance for modeling Down syndrome. *Mamm Genome.* 2011;22(11-12):674-84.

78. Dudek SM, Bear MF. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(10):4363-7.

79. Edwards FA. Anatomy and electrophysiology of fast central synapses lead to a structural model for long-term potentiation. *Physiol Rev.* 1995;75(4):759-87.

80. Eichenbaum H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron.* 2004;44(1):109-20.

81. Erreger K, Dravid SM, Banke TG, Wyllie DJ, Traynelis SF. Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *J Physiol.* 2005;563(Pt 2):345-58.

82. Ethell IM, Pasquale EB. Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol.* 2005;75(3):161-205.

83. Ferrer I, Gullotta F. Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta Neuropathol.* 1990;79(6):680-5.

84. Fitzjohn SM, Irving AJ, Palmer MJ, Harvey J, Lodge D, Collingridge GL. Activation of group I mGluRs potentiates NMDA responses in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett.* 1996;203(3):211-3.

85. Fitzjohn SM, Kingston AE, Lodge D, Collingridge GL. DHPG-induced LTD in area CA1 of juvenile rat hippocampus; characterisation and sensitivity to novel mGlu receptor antagonists. *Neuropharmacology*. 1999;38(10):1577-83.
86. Fitzjohn SM, Palmer MJ, May JE, Neeson A, Morris SA, Collingridge GL. A characterisation of long-term depression induced by metabotropic glutamate receptor activation in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol*. 2001;537(Pt 2):421-30.
87. Freeman SB, Taft LF, Dooley KJ, Allran K, Sherman SL, Hassold TJ, et al. Population-based study of congenital heart defects in Down syndrome. *Am J Med Genet*. 1998;80(3):213-7.
88. Frey U, Krug M, Reymann KG, Matthies H. Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res*. 1988;452(1-2):57-65.
89. Friedmacher F, Puri P. Hirschsprung's disease associated with Down syndrome: a meta-analysis of incidence, functional outcomes and mortality. *Pediatr Surg Int*. 2013;29(9):937-46.
90. Gallagher SM, Daly CA, Bear MF, Huber KM. Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression in hippocampal area CA1. *J Neurosci*. 2004;24(20):4859-64.
91. Gant JC, Chen KC, Norris CM, Kadish I, Thibault O, Blalock EM, et al. Disrupting function of FK506-binding protein 1b/12.6 induces the Ca<sup>2+</sup>-dysregulation aging phenotype in hippocampal neurons. *J Neurosci*. 2011;31(5):1693-703.
92. Gardoni F, Mauceri D, Malinverno M, Polli F, Costa C, Tozzi A, et al. Decreased NR2B subunit synaptic levels cause impaired long-term potentiation but not long-term depression. *J Neurosci*. 2009;29(3):669-77.
93. Ge Y, Dong Z, Bagot RC, Howland JG, Phillips AG, Wong TP, et al. Hippocampal long-term depression is required for the consolidation of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(38):16697-702.
94. Gladding CM, Fitzjohn SM, Molnár E. Metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression: molecular mechanisms. *Pharmacol Rev*. 2009;61(4):395-412.
95. Goh JJ, Manahan-Vaughan D. Endogenous hippocampal LTD that is enabled by spatial object recognition requires activation of NMDA receptors and the metabotropic glutamate receptor, mGlu5. *Hippocampus*. 2013;23(2):129-38.
96. Golden JA, Hyman BT. Development of the superior temporal neocortex is anomalous in trisomy 21. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1994;53(5):513-20.
97. Harris AS, Morrow JS. Calmodulin and calcium-dependent protease I coordinately regulate the interaction of fodrin with actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(8):3009-13.
98. Hartley D, Blumenthal T, Carrillo M, DiPaolo G, Esralew L, Gardiner K, et al. Down syndrome and Alzheimer's disease: Common pathways, common goals. *Alzheimers Dement*. 2015;11(6):700-9.

99. Hartley T, Bird CM, Chan D, Cipolotti L, Husain M, Vargha-Khadem F, et al. The hippocampus is required for short-term topographical memory in humans. *Hippocampus*. 2007;17(1):34-48.
100. Harvey CD, Svoboda K. Locally dynamic synaptic learning rules in pyramidal neuron dendrites. *Nature*. 2007;450(7173):1195-200.
101. Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet*. 2000;355(9199):165-9.
102. Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, et al. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*. 2000;405(6784):311-9.
103. Hebb DO. *The Organization of Behavior*. New York: Wiley. 1949.
104. Henry E, Walker D, Wiedmeier SE, Christensen RD. Hematological abnormalities during the first week of life among neonates with Down syndrome: data from a multihospital healthcare system. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(1):42-50.
105. Henson MA, Tucker CJ, Zhao M, Dudek SM. Long-term depression-associated signaling is required for an in vitro model of NMDA receptor-dependent synapse pruning. *Neurobiol Learn Mem*. 2017;138:39-53.
106. Hérault Y, Delabar JM, Fisher EMC, Tybulewicz VLJ, Yu E, Braut V. Rodent models in Down syndrome research: impact and future opportunities. *Dis Model Mech*. 2017;10(10):1165-86.
107. Heynen AJ, Quinlan EM, Bae DC, Bear MF. Bidirectional, activity-dependent regulation of glutamate receptors in the adult hippocampus in vivo. *Neuron*. 2000;28(2):527-36.
108. Hoeffler CA, Tang W, Wong H, Santillan A, Patterson RJ, Martinez LA, et al. Removal of FKBP12 enhances mTOR-Raptor interactions, LTP, memory, and perseverative/repetitive behavior. *Neuron*. 2008;60(5):832-45.
109. Holbro N, Grunditz A, Oertner TG. Differential distribution of endoplasmic reticulum controls metabotropic signaling and plasticity at hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(35):15055-60.
110. Honey GD, Honey RA, O'Loughlin C, Sharar SR, Kumaran D, Suckling J, et al. Ketamine disrupts frontal and hippocampal contribution to encoding and retrieval of episodic memory: an fMRI study. *Cereb Cortex*. 2005;15(6):749-59.
111. Hou L, Antion MD, Hu D, Spencer CM, Paylor R, Klann E. Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. *Neuron*. 2006;51(4):441-54.
112. Hou L, Klann E. Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci*. 2004;24(28):6352-61.
113. Huang CC, Hsu KS. Sustained activation of metabotropic glutamate receptor 5 and protein tyrosine phosphatases mediate the expression of (S)-3,5-

dihydroxyphenylglycine-induced long-term depression in the hippocampal CA1 region. *J Neurochem.* 2006;96(1):179-94.

114. Huang CC, You JL, Wu MY, Hsu KS. Rap1-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation facilitates AMPA receptor trafficking via the GDI.Rab5 complex. Potential role in (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine-induced long term depression. *J Biol Chem.* 2004;279(13):12286-92.

115. Huber KM, Gallagher SM, Warren ST, Bear MF. Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(11):7746-50.

116. Huber KM, Kayser MS, Bear MF. Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science.* 2000;288(5469):1254-7.

117. Huber KM, Roder JC, Bear MF. Chemical induction of mGluR5- and protein synthesis--dependent long-term depression in hippocampal area CA1. *J Neurophysiol.* 2001;86(1):321-5.

118. Hunt DL, Castillo PE. Synaptic plasticity of NMDA receptors: mechanisms and functional implications. *Curr Opin Neurobiol.* 2012;22(3):496-508.

119. Ireland DR, Abraham WC. Mechanisms of group I mGluR-dependent long-term depression of NMDA receptor-mediated transmission at Schaffer collateral-CA1 synapses. *J Neurophysiol.* 2009;101(3):1375-85.

120. Iyer AM, van Scheppingen J, Milenkovic I, Anink JJ, Adle-Biassette H, Kovacs GG, et al. mTOR Hyperactivation in down syndrome hippocampus appears early during development. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2014;73(7):671-83.

121. Izzo A, Mollo N, Nitti M, Paladino S, Cali G, Genesio R, et al. Mitochondrial dysfunction in down syndrome: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Mol Med.* 2018;24(1):2.

122. Janicki MP, Dalton AJ. Prevalence of dementia and impact on intellectual disability services. *Ment Retard.* 2000;38(3):276-88.

123. Jawaid S, Kidd GJ, Wang J, Swetlik C, Dutta R, Trapp BD. Alterations in CA1 hippocampal synapses in a mouse model of fragile X syndrome. *Glia.* 2018;66(4):789-800.

124. Jedlicka P, Vlachos A, Schwarzacher SW, Deller T. A role for the spine apparatus in LTP and spatial learning. *Behav Brain Res.* 2008;192(1):12-9.

125. Jo K, Derin R, Li M, Brecht DS. Characterization of MALS/Velis-1, -2, and -3: a family of mammalian LIN-7 homologs enriched at brain synapses in association with the postsynaptic density-95/NMDA receptor postsynaptic complex. *J Neurosci.* 1999;19(11):4189-99.

126. Jonas P, Burnashev N. Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. *Neuron.* 1995;15(5):987-90.



127. Kahlem P. Gene-dosage effect on chromosome 21 transcriptome in trisomy 21: implication in Down syndrome cognitive disorders. *Behav Genet.* 2006;36(3):416-28.
128. Kandel ER, Schwartz JH. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science.* 1982;218(4571):433-43.
129. Karmiloff-Smith A, Al-Janabi T, D'Souza H, Groet J, Massand E, Mok K, et al. The importance of understanding individual differences in Down syndrome. *F1000Res.* 2016;5.
130. Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci.* 2010;33(3):121-9.
131. Kash TL, Winder DG. NMDAR LTP and LTD induction: 2B or Not 2B...is that the question?
132. Kasten MR, Connelly T, Fan Y, Schulz PE. A form of synaptically induced metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression that does not require postsynaptic calcium. *Neurosci Lett.* 2012;511(1):12-7.
133. Kemp N, Bashir ZI. Induction of LTD in the adult hippocampus by the synaptic activation of AMPA/kainate and metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology.* 1999;38(4):495-504.
134. Kemp N, McQueen J, Faulkes S, Bashir ZI. Different forms of LTD in the CA1 region of the hippocampus: role of age and stimulus protocol. *Eur J Neurosci.* 2000;12(1):360-6.
135. Kenyon KA, Bushong EA, Mauer AS, Strehler EE, Weinberg RJ, Burette AC. Cellular and subcellular localization of the neuron-specific plasma membrane calcium ATPase PMCA1a in the rat brain. *J Comp Neurol.* 2010;518(16):3169-83.
136. Kesslak JP, Nagata SF, Lott I, Nalcioglu O. Magnetic resonance imaging analysis of age-related changes in the brains of individuals with Down's syndrome. *Neurology.* 1994;44(6):1039-45.
137. Khan I, Malinge S, Crispino J. Myeloid leukemia in Down syndrome. *Crit Rev Oncog.* 2011;16(1-2):25-36.
138. Kim MJ, Dunah AW, Wang YT, Sheng M. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron.* 2005;46(5):745-60.
139. Klann E, Dever TE. Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(12):931-42.
140. Kleppisch T, Voigt V, Allmann R, Offermanns S. G(alpha)q-deficient mice lack metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression but show normal long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *J Neurosci.* 2001;21(14):4943-8.
141. Kleschevnikov AM, Belichenko PV, Gall J, George L, Nosheny R, Maloney MT, et al. Increased efficiency of the GABAA and GABAB receptor-mediated

neurotransmission in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neurobiol Dis.* 2012;45(2):683-91.

142. Kleschevnikov AM, Belichenko PV, Villar AJ, Epstein CJ, Malenka RC, Mobley WC. Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome. *J Neurosci.* 2004;24(37):8153-60.

143. Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol.* 2015;25(23):R1116-21.

144. Köhr G, Seeburg PH. Subtype-specific regulation of recombinant NMDA receptor-channels by protein tyrosine kinases of the src family. *J Physiol.* 1996;492 ( Pt 2):445-52.

145. Kolgeci S, Azemi M, Ahmeti H, Dervishi Z, Sopjani M, Kolgeci J. Recurrent abortions and down syndrome resulting from Robertsonian translocation 21q; 21q. *Med Arch.* 2012;66(5):350-2.

146. Kollurage U, Kudagammana S. Down syndrome caused by 21; 21 robertsonian translocation. *Sri Lanka Journal of Medicine.* 2018. 27(2): 43-45.

147. Korbel JO, Tirosh-Wagner T, Urban AE, Chen XN, Kasowski M, Dai L, et al. The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(29):12031-6.

148. Krinsky-McHale SJ, Devenny DA, Silverman WP. Changes in explicit memory associated with early dementia in adults with Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res.* 2002;46(Pt 3):198-208.

149. Kumar A, Foster TC. Shift in induction mechanisms underlies an age-dependent increase in DHPG-induced synaptic depression at CA3 CA1 synapses. *J Neurophysiol.* 2007;98(5):2729-36.

150. Kurt MA, Kafa MI, Dierssen M, Davies DC. Deficits of neuronal density in CA1 and synaptic density in the dentate gyrus, CA3 and CA1, in a mouse model of Down syndrome. *Brain Res.* 2004;1022(1-2):101-9.

151. Kwon CH, Zhu X, Zhang J, Baker SJ. mTor is required for hypertrophy of Pten-deficient neuronal soma in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(22):12923-8.

152. Lagerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A, Fischer U. Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet.* 2001;10(4):329-38.

153. Lai F, Williams RS. A prospective study of Alzheimer disease in Down syndrome. *Arch Neurol.* 1989;46(8):849-53.

154. Lambert MW. Spectrin and its interacting partners in nuclear structure and function. *Exp Biol Med (Maywood).* 2018;243(6):507-24.

155. Lamprecht R, Farb CR, Rodrigues SM, LeDoux JE. Fear conditioning drives profilin into amygdala dendritic spines. *Nat Neurosci.* 2006;9(4):481-3.

156. Laursen HB. Congenital heart disease in Down's syndrome. *British Heart Journal*. 1976;38(1):32-8.
157. Lee HK, Kameyama K, Haganir RL, Bear MF. NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. *Neuron*. 1998;21(5):1151-62.
158. Lee HW, Kim Y, Han K, Kim H, Kim E. The phosphoinositide 3-phosphatase MTMR2 interacts with PSD-95 and maintains excitatory synapses by modulating endosomal traffic. *J Neurosci*. 2010;30(16):5508-18.
159. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1959; 248: 1721–1722.
160. Levine ES, Crozier RA, Black IB, Plummer MR. Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(17):10235-9.
161. Levine ES, Kolb JE. Brain-derived neurotrophic factor increases activity of NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in excised patches from hippocampal neurons. *J Neurosci Res*. 2000;62(3):357-62.
162. Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab*. 2014;19(3):373-9.
163. Li Z, Zhang Y, Ku L, Wilkinson KD, Warren ST, Feng Y. The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(11):2276-83.
164. Lipton JO, Sahin M. The neurology of mTOR. *Neuron*. 2014;84(2):275-91.
165. Liu L, Wong TP, Pozza MF, Lingenhoehl K, Wang Y, Sheng M, et al. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science*. 2004;304(5673):1021-4.
166. Liu X, Betzenhauser MJ, Reiken S, Meli AC, Xie W, Chen BX, et al. Role of leaky neuronal ryanodine receptors in stress-induced cognitive dysfunction. *Cell*. 2012;150(5):1055-67.
167. Liu X, Gu QH, Duan K, Li Z. NMDA receptor-dependent LTD is required for consolidation but not acquisition of fear memory. *J Neurosci*. 2014;34(26):8741-8.
168. Lu YM, Roder JC, Davidow J, Salter MW. Src activation in the induction of long-term potentiation in CA1 hippocampal neurons. *Science*. 1998;279(5355):1363-7.
169. Lüscher C, Huber KM. Group 1 mGluR-dependent synaptic long-term depression: mechanisms and implications for circuitry and disease. *Neuron*. 2010;65(4):445-59.
170. Lüscher C, Malenka RC. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(6).
171. Lynch G, Baudry M. The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science*. 1984;224(4653):1057-63.

172. Majewska A, Brown E, Ross J, Yuste R. Mechanisms of calcium decay kinetics in hippocampal spines: role of spine calcium pumps and calcium diffusion through the spine neck in biochemical compartmentalization. *J Neurosci*. 2000;20(5):1722-34.
173. Makino H, Malinow R. AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis. *Neuron*. 2009;64(3):381-90.
174. Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science*. 1999;283(5409):1923-7.
175. Malhotra AK, Pinals DA, Weingartner H, Sirocco K, Missar CD, Pickar D, et al. NMDA receptor function and human cognition: the effects of ketamine in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology*. 1996;14(5):301-7.
176. Manahan-Vaughan D, Kulla A, Frey JU. Requirement of translation but not transcription for the maintenance of long-term depression in the CA1 region of freely moving rats. *J Neurosci*. 2000;20(22):8572-6.
177. Mann DM. The pathological association between Down syndrome and Alzheimer disease. *Mech Ageing Dev*. 1988;43(2):99-136.
178. Mansfield C, Hopfer S, Marteau TM. Termination rates after prenatal diagnosis of Down syndrome, spina bifida, anencephaly, and Turner and Klinefelter syndromes: a systematic literature review. European Concerted Action: DADA (Decision-making After the Diagnosis of a fetal Abnormality). *Prenat Diagn*. 1999;19(9):808-12.
179. Mao R, Zielke CL, Zielke HR, Pevsner J. Global up-regulation of chromosome 21 gene expression in the developing Down syndrome brain. *Genomics*. 2003;81(5):457-67.
180. Marin-Padilla M. Pyramidal cell abnormalities in the motor cortex of a child with Down's syndrome. A Golgi study. *J Comp Neurol*. 1976;167(1):63-81.
181. Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci*. 2000;23:649-711.
182. Martínez-Cué C, Martínez P, Rueda N, Vidal R, García S, Vidal V, et al. Reducing GABAA  $\alpha 5$  receptor-mediated inhibition rescues functional and neuromorphological deficits in a mouse model of down syndrome. *J Neurosci*. 2013;33(9):3953-66.
183. Massey PV, Johnson BE, Moulton PR, Auberson YP, Brown MW, Molnar E, et al. Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci*. 2004;24(36):7821-8.
184. Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*. 2004;429(6993):761-6.
185. McCarron M, McCallion P, Reilly E, Dunne P, Carroll R, Mulryan N. A prospective 20-year longitudinal follow-up of dementia in persons with Down syndrome. *J Intellect Disabil Res*. 2017;61(9):843-52.

186. Merrick J, Koslowe K. Refractive errors and visual anomalies in Down syndrome. *Downs Syndr Res Pract.* 2001;6(3):131-3.
187. Mi H, Ebert D, Muruganujan A, Mills C, Albou LP, Mushayamaha T, et al. PANTHER version 16: a revised family classification, tree-based classification tool, enhancer regions and extensive API. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D394-D403.
188. Mitra A, Blank M, Madison DV. Developmentally altered inhibition in Ts65Dn, a mouse model of Down syndrome. *Brain Res.* 2012;1440:1-8.
189. Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* 2007;3(6):542-5.
190. Morishita W, Lu W, Smith GB, Nicoll RA, Bear MF, Malenka RC. Activation of NR2B-containing NMDA receptors is not required for NMDA receptor-dependent long-term depression. *Neuropharmacology.* 2007;52(1):71-6.
191. Morita D, Rah JC, Isaac JT. Incorporation of inwardly rectifying AMPA receptors at silent synapses during hippocampal long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014;369(1633):20130156.
192. Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature.* 1986;319(6056):774-6.
193. Moulton PR, Corrêa SA, Collingridge GL, Fitzjohn SM, Bashir ZI. Co-activation of p38 mitogen-activated protein kinase and protein tyrosine phosphatase underlies metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Physiol.* 2008;586(10):2499-510.
194. Mulkey RM, Herron CE, Malenka RC. An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science.* 1993;261(5124):1051-5.
195. Mulkey RM, Malenka RC. Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron.* 1992;9(5):967-75.
196. Mullins D, Daly E, Simmons A, Beacher F, Foy CML, Lovestone S, et al. Dementia in Down's syndrome: an MRI comparison with Alzheimer's disease in the general population. *Journal of Neurodevelopmental Disorders.* 2013;5(1):19.
197. Nadif Kasri N, Nakano-Kobayashi A, Van Aelst L. Rapid synthesis of the X-linked mental retardation protein OPHN1 mediates mGluR-dependent LTD through interaction with the endocytic machinery. *Neuron.* 2011;72(2):300-15.
198. Nägerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB, Bonhoeffer T. Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron.* 2004;44(5):759-67.
199. Nakahata Y, Yasuda R. Plasticity of Spine Structure: Local Signaling, Translation and Cytoskeletal Reorganization. *Front Synaptic Neurosci.* 2018;10:29.
200. Nakayama AY, Harms MB, Luo L. Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.* 2000;20(14):5329-38.

201. Namekata K, Enokido Y, Iwasawa K, Kimura H. MOCA induces membrane spreading by activating Rac1. *J Biol Chem.* 2004;279(14):14331-7.
202. Namekata K, Kimura A, Kawamura K, Guo X, Harada C, Tanaka K, et al. Dock3 attenuates neural cell death due to NMDA neurotoxicity and oxidative stress in a mouse model of normal tension glaucoma. *Cell Death Differ.* 2013;20(9):1250-6.
203. Narayanan U, Nalavadi V, Nakamoto M, Pallas DC, Ceman S, Bassell GJ, et al. FMRP phosphorylation reveals an immediate-early signaling pathway triggered by group I mGluR and mediated by PP2A. *J Neurosci.* 2007;27(52):14349-57.
204. Narayanan U, Nalavadi V, Nakamoto M, Thomas G, Ceman S, Bassell GJ, et al. S6K1 phosphorylates and regulates fragile X mental retardation protein (FMRP) with the neuronal protein synthesis-dependent mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade. *J Biol Chem.* 2008;283(27):18478-82.
205. Natoli JL, Ackerman DL, McDermott S, Edwards JG. Prenatal diagnosis of Down syndrome: a systematic review of termination rates (1995-2011). *Prenat Diagn.* 2012;32(2):142-53.
206. Nelson L, Johnson JK, Freedman M, Lott I, Groot J, Chang M, et al. Learning and memory as a function of age in Down syndrome: a study using animal-based tasks. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2005;29(3):443-53.
207. Neves G, Cooke SF, Bliss TV. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(1):65-75.
208. Newcomer JW, Farber NB, Jevtovic-Todorovic V, Selke G, Melson AK, Hershey T, et al. Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis. *Neuropsychopharmacology.* 1999;20(2):106-18.
209. Niere F, Raab-Graham KF. mTORC1 Is a Local, Postsynaptic Voltage Sensor Regulated by Positive and Negative Feedback Pathways. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:152.
210. Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K. Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:313-53.
211. Nosyreva ED, Huber KM. Developmental switch in synaptic mechanisms of hippocampal metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci.* 2005;25(11):2992-3001.
212. O'Riordan K, Gerstein H, Hullinger R, Burger C. The role of Homer1c in metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. *Hippocampus.* 2014;24(1):1-6.
213. Oh WC, Hill TC, Zito K. Synapse-specific and size-dependent mechanisms of spine structural plasticity accompanying synaptic weakening. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(4):E305-12.
214. Oka A, Takashima S. The up-regulation of metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in Down's syndrome brains. *Acta Neuropathol.* 1999;97(3):275-8.

215. Oliek SH, Malenka RC, Nicoll RA. Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neuron*. 1997;18(6):969-82.
216. Ostroff LE, Fiala JC, Allwardt B, Harris KM. Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron*. 2002;35(3):535-45.
217. Otani S, Connor JA. Requirement of rapid Ca<sup>2+</sup> entry and synaptic activation of metabotropic glutamate receptors for the induction of long-term depression in adult rat hippocampus. *J Physiol*. 1998;511 ( Pt 3):761-70.
218. Palmer MJ, Irving AJ, Seabrook GR, Jane DE, Collingridge GL. The group I mGlu receptor agonist DHPG induces a novel form of LTD in the CA1 region of the hippocampus. *Neuropharmacology*. 1997;36(11-12):1517-32.
219. Park P, Volianskis A, Sanderson TM, Bortolotto ZA, Jane DE, Zhuo M, et al. NMDA receptor-dependent long-term potentiation comprises a family of temporally overlapping forms of synaptic plasticity that are induced by different patterns of stimulation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369(1633):20130131.
220. Park S, Park JM, Kim S, Kim JA, Shepherd JD, Smith-Hicks CL, et al. Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of Arc/Arg3.1 essential for mGluR-LTD. *Neuron*. 2008;59(1):70-83.
221. Pascual-Leone A, Amedi A, Fregni F, Merabet LB. The plastic human brain cortex. *Annu Rev Neurosci*. 2005;28:377-401.
222. Pennington BF, Moon J, Edgin J, Stedron J, Nadel L. The neuropsychology of Down syndrome: evidence for hippocampal dysfunction. *Child Dev*. 2003;74(1):75-93.
223. Pérez-Otaño I, Ehlers MD. Learning from NMDA receptor trafficking: clues to the development and maturation of glutamatergic synapses. *Neurosignals*. 2004;13(4):175-89.
224. Perluigi M, Pupo G, Tramutola A, Cini C, Coccia R, Barone E, et al. Neuropathological role of PI3K/Akt/mTOR axis in Down syndrome brain. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(7):1144-53.
225. Petersen MB, Adelsberger PA, Schinzel AA, Binkert F, Hinkel GK, Antonarakis SE. Down syndrome due to de novo Robertsonian translocation t(14q;21q): DNA polymorphism analysis suggests that the origin of the extra 21q is maternal. *Am J Hum Genet*. 1991;49(3):529-36.
226. Pick JE, Khatri L, Sathler MF, Ziff EB. mGluR long-term depression regulates GluA2 association with COPII vesicles and exit from the endoplasmic reticulum. *EMBO J*. 2017;36(2):232-44.
227. Pick JE, Ziff EB. Regulation of AMPA receptor trafficking and exit from the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Neurosci*. 2018;91:3-9.
228. Pierce JP, Mayer T, McCarthy JB. Evidence for a satellite secretory pathway in neuronal dendritic spines. *Curr Biol*. 2001;11(5):351-5.

229. Pierce JP, van Leyen K, McCarthy JB. Translocation machinery for synthesis of integral membrane and secretory proteins in dendritic spines. *Nat Neurosci.* 2000;3(4):311-3.
230. Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, et al. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell.* 1991;66(4):817-22.
231. Pinter JD, Brown WE, Eliez S, Schmitt JE, Capone GT, Reiss AL. Amygdala and hippocampal volumes in children with Down syndrome: a high-resolution MRI study. *Neurology.* 2001;56(7):972-4.
232. Pinter JD, Eliez S, Schmitt JE, Capone GT, Reiss AL. Neuroanatomy of Down's syndrome: a high-resolution MRI study. *Am J Psychiatry.* 2001;158(10):1659-65.
233. Piochon C, Kano M, Hansel C. LTD-like molecular pathways in developmental synaptic pruning. *Nat Neurosci.* 2016;19(10):1299-310.
234. Ramiro-Cortés Y, Israely I. Long lasting protein synthesis- and activity-dependent spine shrinkage and elimination after synaptic depression. *PLoS One.* 2013;8(8):e71155.
235. Rauner C, Köhr G. Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors constitute the major N-methyl-D-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses. *J Biol Chem.* 2011;286(9):7558-66.
236. Raymond CR, Thompson VL, Tate WP, Abraham WC. Metabotropic glutamate receptors trigger homosynaptic protein synthesis to prolong long-term potentiation. *J Neurosci.* 2000;20(3):969-76.
237. Raz N, Torres IJ, Briggs SD, Spencer WD, Thornton AE, Loken WJ, et al. Selective neuroanatomic abnormalities in Down's syndrome and their cognitive correlates: evidence from MRI morphometry. *Neurology.* 1995;45(2):356-66.
238. Reeves RH, Irving NG, Moran TH, Wohn A, Kitt C, Sisodia SS, et al. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat Genet.* 1995;11(2):177-84.
239. Roberson ED, English JD, Adams JP, Selcher JC, Kondratieff C, Sweatt JD. The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci.* 1999;19(11):4337-48.
240. Rockstroh S, Emre M, Tarral A, Pokorny R. Effects of the novel NMDA-receptor antagonist SDZ EAA 494 on memory and attention in humans. *Psychopharmacology (Berl).* 1996;124(3):261-6.
241. Ronesi JA, Huber KM. Homer interactions are necessary for metabotropic glutamate receptor-induced long-term depression and translational activation. *J Neurosci.* 2008;28(2):543-7.
242. Rouach N, Nicoll RA. Endocannabinoids contribute to short-term but not long-term mGluR-induced depression in the hippocampus. *Eur J Neurosci.* 2003;18(4):1017-20.



243. Sabatini BL, Oertner TG, Svoboda K. The life cycle of Ca(2+) ions in dendritic spines. *Neuron*. 2002;33(3):439-52.
244. Sago H, Carlson EJ, Smith DJ, Kilbridge J, Rubin EM, Mobley WC, et al. Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(11):6256-61.
245. Sago H, Carlson EJ, Smith DJ, Rubin EM, Crnic LS, Huang TT, et al. Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome. *Pediatr Res*. 2000;48(5):606-13.
246. Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, et al. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature*. 1995;373(6510):151-5.
247. Sanderson TM, Hogg EL, Collingridge GL, Corrêa SA. Hippocampal metabotropic glutamate receptor long-term depression in health and disease: focus on mitogen-activated protein kinase pathways. *J Neurochem*. 2016;139 Suppl 2:200-14.
248. Saugstad JA, Ingram SL. Group I Metabotropic Glutamate Receptors (mGlu1 and mGlu5). In: Gereau R.W., Swanson G.T. (eds) *The Glutamate Receptors. The Receptors*. Humana Press. 2008.
249. Schaeffer C, Bardoni B, Mandel JL, Ehresmann B, Ehresmann C, Moine H. The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *EMBO J*. 2001;20(17):4803-13.
250. Schieve LA, Boulet SL, Boyle C, Rasmussen SA, Schendel D. Health of children 3 to 17 years of age with Down syndrome in the 1997-2005 national health interview survey. *Pediatrics*. 2009;123(2):e253-60.
251. Schreiber KH, Ortiz D, Academia EC, Anies AC, Liao CY, Kennedy BK. Rapamycin-mediated mTORC2 inhibition is determined by the relative expression of FK506-binding proteins. *Aging Cell*. 2015;14(2):265-73.
252. Scott-McKean JJ, Costa AC. Exaggerated NMDA mediated LTD in a mouse model of Down syndrome and pharmacological rescuing by memantine. *Learn Mem*. 2011;18(12):774-8.
253. Scott-McKean JJ, Roque AL, Surewicz K, Johnson MW, Surewicz WK, Costa ACS. Pharmacological Modulation of Three Modalities of CA1 Hippocampal Long-Term Potentiation in the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome. *Neural Plast*. 2018;2018:9235796.
254. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957;20(1):11-21.
255. Segal M, Korkotian E. Endoplasmic reticulum calcium stores in dendritic spines. *Front Neuroanat*. 2014;8:64.
256. Setou M, Nakagawa T, Seog DH, Hirokawa N. Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science*. 2000;288(5472):1796-802.

257. Sharp AH, McPherson PS, Dawson TM, Aoki C, Campbell KP, Snyder SH. Differential immunohistochemical localization of inositol 1,4,5-trisphosphate- and ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> release channels in rat brain. *J Neurosci.* 1993;13(7):3051-63.
258. Shehata M, Matsumura H, Okubo-Suzuki R, Ohkawa N, Inokuchi K. Neuronal stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor degradation after chemical long-term depression. *J Neurosci.* 2012;32(30):10413-22.
259. Shimizu E, Tang YP, Rampon C, Tsien JZ. NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science.* 2000;290(5494):1170-4.
260. Shukkur EA, Shimohata A, Akagi T, Yu W, Yamaguchi M, Murayama M, et al. Mitochondrial dysfunction and tau hyperphosphorylation in Ts1Cje, a mouse model for Down syndrome. *Hum Mol Genet.* 2006;15(18):2752-62.
261. Siarey RJ, Carlson EJ, Epstein CJ, Balbo A, Rapoport SI, Galdzicki Z. Increased synaptic depression in the Ts65Dn mouse, a model for mental retardation in Down syndrome. *Neuropharmacology.* 1999;38(12):1917-20.
262. Siarey RJ, Stoll J, Rapoport SI, Galdzicki Z. Altered long-term potentiation in the young and old Ts65Dn mouse, a model for Down Syndrome. *Neuropharmacology.* 1997;36(11-12):1549-54.
263. Siarey RJ, Villar AJ, Epstein CJ, Galdzicki Z. Abnormal synaptic plasticity in the Ts1Cje segmental trisomy 16 mouse model of Down syndrome. *Neuropharmacology.* 2005;49(1):122-8.
264. Siman R, Baudry M, Lynch G. Regulation of glutamate receptor binding by the cytoskeletal protein fodrin. *Nature.* 1985;313(5999):225-8.
265. Spacek J. Three-dimensional analysis of dendritic spines. II. Spine apparatus and other cytoplasmic components. *Anat Embryol (Berl).* 1985;171(2):235-43.
266. Spacek J, Harris KM. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J Neurosci.* 1997;17(1):190-203.
267. Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev.* 1992;99(2):195-231.
268. Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, et al. DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet.* 1992;1(6):397-400.
269. Takashima S, Becker LE, Armstrong DL, Chan F. Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study. *Brain Res.* 1981;225(1):1-21.
270. Takeuchi T, Duzkiewicz AJ, Morris RG. The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014;369(1633):20130288.

271. Takkala P, Woodin MA. Muscarinic acetylcholine receptor activation prevents disinhibition-mediated LTP in the hippocampus. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:16.
272. Tanaka J, Horiike Y, Matsuzaki M, Miyazaki T, Ellis-Davies GC, Kasai H. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science.* 2008;319(5870):1683-7.
273. Tang G, Gudsnuk K, Kuo SH, Cotrina ML, Rosoklija G, Sosunov A, et al. Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron.* 2014;83(5):1131-43.
274. Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature.* 1999;401(6748):63-9.
275. Tang YP, Wang H, Feng R, Kyin M, Tsien JZ. Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology.* 2001;41(6):779-90.
276. Teyler TJ, Cavus I, Coussens C. Synaptic plasticity in the hippocampal slice: functional consequences. *J Neurosci Methods.* 1995;59(1):11-7.
277. Togashi H, Abe K, Mizoguchi A, Takaoka K, Chisaka O, Takeichi M. Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron.* 2002;35(1):77-89.
278. Troca-Marín JA, Alves-Sampaio A, Montesinos ML. An increase in basal BDNF provokes hyperactivation of the Akt-mammalian target of rapamycin pathway and deregulation of local dendritic translation in a mouse model of Down's syndrome. *J Neurosci.* 2011;31(26):9445-55.
279. Troca-Marín JA, Alves-Sampaio A, Tejedor FJ, Montesinos ML. Local translation of dendritic RhoA revealed by an improved synaptoneurosome preparation. *Mol Cell Neurosci.* 2010;43(3):308-14.
280. Troca-Marín JA, Casañas JJ, Benito I, Montesinos ML. The Akt-mTOR pathway in Down's syndrome: the potential use of rapamycin/rapalogs for treating cognitive deficits. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2014;13(1):34-40.
281. Tsai PT, Greene-Colozzi E, Goto J, Anderl S, Kwiatkowski DJ, Sahin M. Prenatal rapamycin results in early and late behavioral abnormalities in wildtype C57BL/6 mice. *Behav Genet.* 2013;43(1):51-9.
282. Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell.* 1996;87(7):1327-38.
283. Valenti D, Braidy N, De Rasmio D, Signorile A, Rossi L, Atanasov AG, et al. Mitochondria as pharmacological targets in Down syndrome. *Free Radic Biol Med.* 2018;114:69-83.
284. Valenti D, de Bari L, De Filippis B, Henrion-Caude A, Vacca RA. Mitochondrial dysfunction as a central actor in intellectual disability-related diseases: an overview of Down syndrome, autism, Fragile X and Rett syndrome. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014;46 Pt 2:202-17.

285. van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(4):272-82.
286. Vicini S, Wang JF, Li JH, Zhu WJ, Wang YH, Luo JH, et al. Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurophysiol.* 1998;79(2):555-66.
287. Volianskis A, France G, Jensen MS, Bortolotto ZA, Jane DE, Collingridge GL. Long-term potentiation and the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res.* 2015;1621:5-16.
288. Volk LJ, Pfeiffer BE, Gibson JR, Huber KM. Multiple Gq-coupled receptors converge on a common protein synthesis-dependent long-term depression that is affected in fragile X syndrome mental retardation. *J Neurosci.* 2007;27(43):11624-34.
289. Wang H, Ardiles AO, Yang S, Tran T, Posada-Duque R, Valdivia G, et al. Metabotropic Glutamate Receptors Induce a Form of LTP Controlled by Translation and Arc Signaling in the Hippocampus. *J Neurosci.* 2016a;36(5):1723-9.
290. Wang YY, Liu S, Zhang N, Yang J, Zhang Y. Impaired hippocampal synaptic plasticity and NR2A/2B expression ratio in remifentanyl withdrawal rats. *Neurotoxicology.* 2016b;53:115-23.
291. Waung MW, Huber KM. Protein translation in synaptic plasticity: mGluR-LTD, Fragile X. *Curr Opin Neurobiol.* 2009;19(3):319-26.
292. Wechsler A, Teichberg VI. Brain spectrin binding to the NMDA receptor is regulated by phosphorylation, calcium and calmodulin. *EMBO J.* 1998;17(14):3931-9.
293. Westmark CJ, Malter JS. FMRP mediates mGluR5-dependent translation of amyloid precursor protein. *PLoS Biol.* 2007;5(3):e52.
294. Wiens KM, Lin H, Liao D. Rac1 induces the clustering of AMPA receptors during spinogenesis. *J Neurosci.* 2005;25(46):10627-36.
295. Wiera G, Mozrzymas JW. Extracellular proteolysis in structural and functional plasticity of mossy fiber synapses in hippocampus. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:427.
296. Wisniewski KE, Dalton AJ, McLachlan C, Wen GY, Wisniewski HM. Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies. *Neurology.* 1985;35(7):957-61.
297. Wisniewski KE, Wisniewski HM, Wen GY. Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann Neurol.* 1985;17(3):278-82.
298. Witke W, Sutherland JD, Sharpe A, Arai M, Kwiatkowski DJ. Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(7):3832-6.

299. Yashiro K, Philpot BD. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology*. 2008;55(7):1081-94.
300. Yasuda H, Huang Y, Tsumoto T. Regulation of excitability and plasticity by endocannabinoids and PKA in developing hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(8):3106-11.
301. Yuste, R. *Dendritic Spines*. MIT Press. 2010.
302. Zhang L, Zhang P, Wang G, Zhang H, Zhang Y, Yu Y, et al. Ras and Rap Signal Bidirectional Synaptic Plasticity via Distinct Subcellular Microdomains. *Neuron*. 2018;98(4):783-800.e4.
303. Zhang XL, Zhou ZY, Winterer J, Müller W, Stanton PK. NMDA-dependent, but not group I metabotropic glutamate receptor-dependent, long-term depression at Schaffer collateral-CA1 synapses is associated with long-term reduction of release from the rapidly recycling presynaptic vesicle pool. *J Neurosci*. 2006;26(40):10270-80.
304. Zhou Q, Homma KJ, Poo MM. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*. 2004;44(5):749-57.
305. Zhu G, Briz V, Seinfeld J, Liu Y, Bi X, Baudry M. Calpain-1 deletion impairs mGluR-dependent LTD and fear memory extinction. *Sci Rep*. 2017;7:42788.
306. Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R. Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell*. 2002;110(4):443-55.
307. Zhu PJ, Chen C-J, Mays J, Stoica L, Costa-Mattioli M. mTORC2, but not mTORC1, is required for hippocampal mGluR-LTD and associated behaviors. *Nature Neuroscience*. 2018;21(6):799-802.
308. Zhu YY, Jing L, Duan TT, Yuan Q, Cao J, Zhou QX, et al. Patterned high-frequency stimulation induces a form of long-term depression dependent on GABAA and mACh receptors in the hippocampus. *Neuroscience*. 2013;250:658-63.
309. Zhu Y, Pak D, Qin Y, McCormack SG, Kim MJ, Baumgart JP, et al. Rap2-JNK removes synaptic AMPA receptors during depotentiation. *Neuron*. 2005;46(6):905-16.



## ***ANEXO I. Puesta a punto y optimización del sistema de electrofisiología MEA.***

### *I.I Puesta a punto y optimización del sistema MEA para su aplicación en rodajas agudas de hipocampo.*

El sistema MEA es un sistema de electrofisiología basado en el registro simultáneo de electrodos distribuidos en una matriz. Este sistema cuenta con varios modelos de dispositivo con diferente aplicabilidad entre los que se encuentran los dos modelos evaluados durante el desarrollo de este trabajo, el MEA plano y el MEA 3D. Previamente se optimizó el procedimiento de corte y obtención de rodajas de hipocampo, así como el protocolo de registro en la cámara del MEA. Se evaluaron variaciones del protocolo de procesamiento de rodajas y del protocolo de estimulación en el hipocampo considerando dos aspectos fundamentalmente: la viabilidad de la rodaja y la adherencia a la superficie del MEA.

En este trabajo previo se observó que la viabilidad de las rodajas era superior al aplicar el protocolo descrito como “protocolo de corte protegido”, en el que se hace sustitución parcial de sodio por sacarosa en la composición del ACSF empleado durante el procedimiento de corte. Del mismo modo, se estableció el procedimiento de colocación de las rodajas que garantizase la mejor adherencia a la superficie del MEA y se determinó el protocolo de estimulación basal que son los aplicados en el presente trabajo y que se describen en el apartado de Materiales y Métodos.

Como parte del trabajo desarrollado en esta tesis, se continuó con el procedimiento de optimización del registro en MEA evaluando dos tipos de dispositivo, el MEA plano y el MEA 3D.

### *I.II Dispositivos MEA (matriz de microelectrodos).*

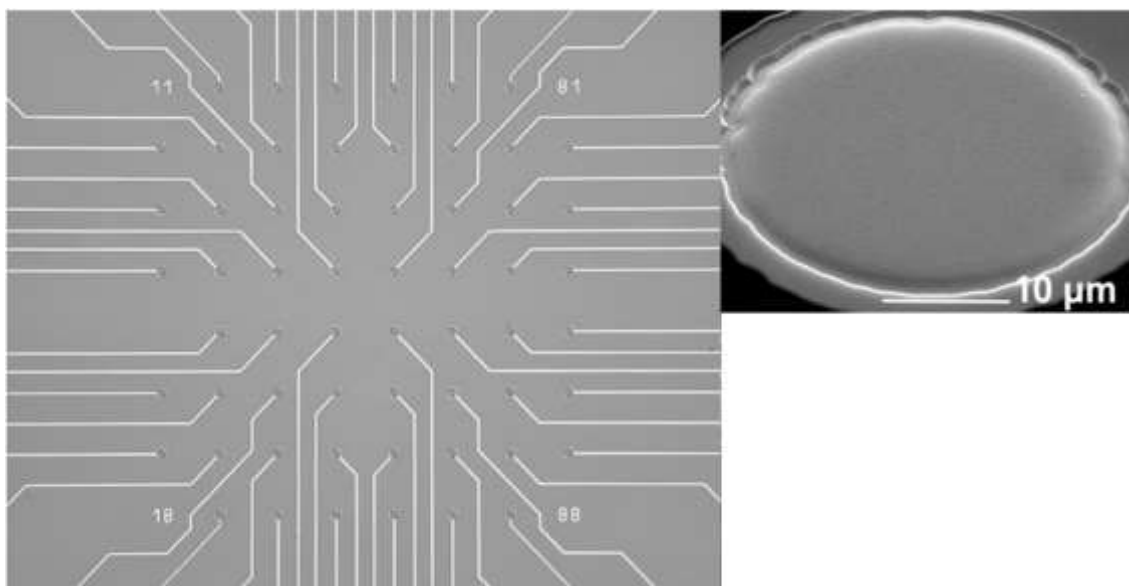
El MEA plano (MultiChannel Systems; Ref. 60MEA200/30iR-Ti) consta de 59 electrodos planos con un diámetro de 30 $\mu$ m y un electrodo de referencia correspondiente a la posición 15 (columna 1, fila 5) distribuidos en una matriz de 8x8 con 200 $\mu$ m de espacio entre los electrodos. Las pistas y los electrodos presentan aislamiento de SiN y el material de la base es cristal.

El MEA 3D (MultiChannel Systems; Ref. 60-3DMEA200/12/50iR-gr) consta de 59 electrodos cónicos de TiN con un diámetro de 12  $\mu$ m (100 $\mu$ m en la base) y una altura de 50  $\mu$ m, que se distribuyen en una matriz de 8x8 con una distancia entre electrodos de

200  $\mu\text{m}$ . Al igual que los MEAs planos, los 3D presentan un electrodo de referencia interna situado en la posición 15 (columna 1, fila 5) de la matriz. El material de aislamiento de las pistas y electrodos es SiN y el material base del MEA3D es cristal.

### *I.III MEA plano vs. MEA 3D.*

Se evaluaron experimentos realizados con MEAs planos (**Fig. 25**) y MEAs 3D (**Fig. 26**) atendiendo a 2 parámetros. En primer lugar, se evaluó el porcentaje de rodajas que mostraban una respuesta de amplitud superior o igual a 100  $\mu\text{V}$  al estimular con  $-/+1750$  mV a nivel de la sinapsis de las colaterales de Schaffer con las dendritas de la región stratum radiatum de la CA1, con el propósito de determinar la capacidad de registro del sistema y el posible efecto de la distancia de contacto del tejido con los electrodos. Con el mismo propósito, se estudió también la distribución de las amplitudes de respuesta en los casos en los que se observaban respuestas superiores o iguales a los 100  $\mu\text{V}$  al aplicar el mismo estímulo.

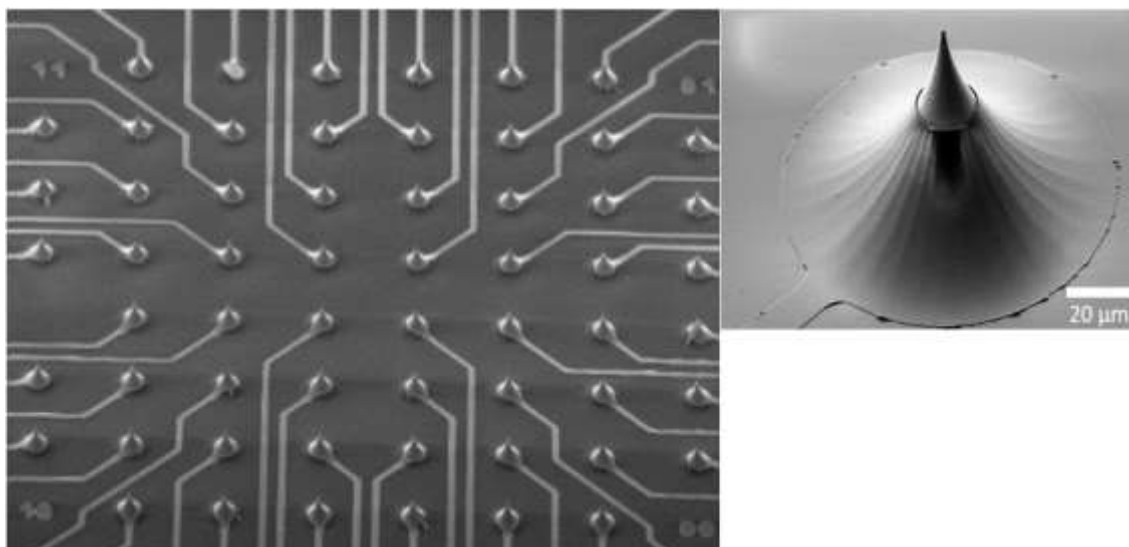


**Figura 25. MEA plano.** Se muestra la matriz de electrodos del modelo plano (izquierda) y una magnificación de los electrodos planos (derecha). Tomado de <https://www.multichannelsystems.com/>.

Para el primer parámetro analizado se obtuvo que, en el caso del MEA plano, para un total de 122 rodajas de hipocampo en las que se pudo evaluar de manera cuantitativa la amplitud de respuesta al estimular con  $-/+1750$  mV, un 27,87% mostraron una respuesta igual o superior a los 100  $\mu\text{V}$ . En esas rodajas las amplitudes se distribuyeron en un rango entre 100 y 600  $\mu\text{V}$ . Se estudió la distribución de las amplitudes de respuesta, agrupando en rangos de 100  $\mu\text{V}$ , y se obtuvo que más del 50% de las rodajas evaluadas



con respuesta superior a 100  $\mu\text{V}$  presentaban una amplitud comprendida en el rango de 100 a 199  $\mu\text{V}$  (100-199  $\mu\text{V}$ : 61,76%; 200-299  $\mu\text{V}$ : 23,53%; 300-399  $\mu\text{V}$ : 8,82%; 400-499  $\mu\text{V}$ : 2,94%; 500-599  $\mu\text{V}$ : 0%; 600-699: 2,94%; 700-799  $\mu\text{V}$ : 0%).



**Figura 26. MEA 3D.** Se muestra la matriz de electrodos del modelo 3D (izquierda) y una magnificación de los electrodos 3D (derecha). Tomado de <https://www.multichannelsystems.com/>.

En el caso del MEA 3D, para un total de 319 rodajas de hipocampo evaluadas, en un 50,47% de los casos se obtuvo una respuesta igual o superior a los 100  $\mu\text{V}$  al estimular con  $-/+1750$  mV. Al evaluar la distribución de amplitudes se obtuvo un rango que comprendía respuestas de amplitudes desde los 100 a los 700  $\mu\text{V}$  (100-199  $\mu\text{V}$ : 45,43%; 200-299  $\mu\text{V}$ : 26,09%; 300-399  $\mu\text{V}$ : 13,66%; 400-499  $\mu\text{V}$ : 6,21%; 500-599  $\mu\text{V}$ : 3,73%; 600-699: 3,11%; 700-799  $\mu\text{V}$ : 1,86%).

Para evaluar la estabilidad de la rodaja en los MEAs se contabilizó la proporción de registros completos. Se consideraron registros completos aquellos registros de al menos 2 horas de duración en los que la respuesta no desapareció ni decayó de manera progresiva, y se conservó estable dentro de los parámetros experimentales de cada caso concreto.

En el caso del MEA plano, de un total de 265 rodajas en las que se pudo evaluar la estabilidad de la respuesta, solo para el 5,28% de las rodajas se obtuvo registro completo que además cumpliera con la condición de haber generado una respuesta de amplitud superior o igual a 100  $\mu\text{V}$  al estimular con  $-/+1750$  mV a nivel de la sinapsis de las colaterales de Schaffer con las dendritas de la región stratum radiatum de la CA1. Para

el MEA 3D, de las 319 rodajas analizadas, se obtuvo registro completo en un 22,57% de los casos.

Estos resultados sugerían que la utilización del MEA 3D supone una mejora tanto en la amplitud de la respuesta registrada como en la estabilidad de dicha respuesta y del propio registro en la rodaja, en comparación con el dispositivo MEA plano. Este incremento de amplitud de la respuesta de las rodajas se asume que es debido a la penetración de los electrodos en las capas celulares internas de la rodaja, que presentan menor daño por el corte, y donde la conectividad neuronal presenta mayor integridad. Esta capacidad de los electrodos 3D de penetrar en el tejido también incrementa el contacto de la rodaja con los electrodos, eliminando uno de los principales problemas observados en el trabajo con los dispositivos planos que es la falta de adherencia con la superficie del dispositivo, lo que produce un mal contacto con los electrodos y, como consecuencias, menor amplitud de la respuesta. La estabilidad de los registros también podría estar asociada a este compromiso con la adherencia al dispositivo, ya que el decremento o pérdida de la respuesta observada podría deberse a la pérdida progresiva del contacto de los electrodos con la rodaja.

## **ANEXO II. *Material Suplementario.***

### **Archivo Suplementario 1.**

- Tabla S1. Datos crudos de los niveles de expresión de proteínas en SNs Ts1Cje, Ts1Cje RAPA y WT RAPA referenciados a muestra WT.
- Tabla S2. Niveles de expresión de proteínas con al menos 2 péptidos únicos identificados en SNs Ts1Cje, Ts1Cje RAPA y WT RAPA referenciados a muestra WT.
- Tabla S3. Media geométrica de los niveles de expresión de proteínas con al menos 2 péptidos únicos identificados para los grupos de estudio Ts1Cje, Ts1Cje RAPA y WT RAPA referenciados a muestra WT.
- Tabla S4. Análisis PANTHER. Datos de representación en la muestra proteómica para la categoría “*PANTHER Go-Slim Cellular Component*” comparado con el genoma completo de ratón.

### **Archivo Suplementario 2**

- Tabla S5. Proteínas afectadas de forma similar en SNs WT RAPA y Ts1Cje RAPA.
- Tabla S6. Rutas canónicas afectadas en SNs Ts1Cje, Ts1Cje RAPA y WT RAPA.
- Tabla S7. Análisis Z-score de las rutas canónicas en SNs Ts1Cje, Ts1Cje RAPA y WT RAPA


**ANEXO III. *Publicación “Prenatal treatment with rapamycin restores enhanced hippocampal mGluR-LTD and mushroom spine size in a Down’s syndrome mouse model”.***

RESEARCH

Open Access



# Prenatal treatment with rapamycin restores enhanced hippocampal mGluR-LTD and mushroom spine size in a Down's syndrome mouse model

Jesús David Urbano-Gómez<sup>1,2</sup>, Juan José Casañas<sup>1,2</sup>, Itziar Benito<sup>1,2,3</sup> and María Luz Montesinos<sup>1,2\*</sup> 

## Abstract

Down syndrome (DS) is the most frequent genetic cause of intellectual disability including hippocampal-dependent memory deficits. We have previously reported hippocampal mTOR (mammalian target of rapamycin) hyperactivation, and related plasticity as well as memory deficits in Ts1Cje mice, a DS experimental model. Here we characterize the proteome of hippocampal synaptoneurosomes (SNs) from these mice, and found a predicted alteration of synaptic plasticity pathways, including long term depression (LTD). Accordingly, mGluR-LTD (metabotropic Glutamate Receptor-LTD) is enhanced in the hippocampus of Ts1Cje mice and this is correlated with an increased proportion of a particular category of mushroom spines in hippocampal pyramidal neurons. Remarkably, prenatal treatment of these mice with rapamycin has a positive pharmacological effect on both phenotypes, supporting the therapeutic potential of rapamycin/rapalogs for DS intellectual disability.

**Keywords:** mGluR-LTD, mTOR, Dendritic spines, Proteomics, Down syndrome, Synaptoneurosomes, Trisomy 21

## Introduction

DS, also known as trisomy 21, is one of the most common causes of intellectual disability. Among other difficulties, DS patients experience learning and memory deficits that evidence hippocampal dysfunctions [1]. We have previously shown that synaptic local translation, a key process for plasticity and hippocampal-dependent memory, is deregulated in the DS mouse model Ts1Cje [2] due to mTOR hyperactivation [3]. Accordingly, mTOR hyperactivation has been also found in subjects with DS [4, 5]. In Ts1Cje mice, mTOR hyperactivation seems to be caused by increased levels of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) that saturate the BDNF–TrkB–Akt–mTOR

signaling axis [3, 6]. Furthermore, we also found that the BDNF-dependent Long-Term Potentiation (LTP) is abolished in the Ts1Cje hippocampus, and that the specific mTOR inhibitor rapamycin fully restored this type of plasticity [7]. Moreover, we observed that the impaired persistence of long-term memory (LTM) in the Barnes maze of Ts1Cje animals was also restored by rapamycin treatment [7].

The mTOR pathway is known to participate in other forms of plasticity, such as mGluR-LTD. This is mediated by group I metabotropic glutamate receptors and relies on protein translation [8]. mTOR forms two different complexes: mTORC1, which contains, among other components, the defining protein RAPTOR (Regulatory Associated Protein of mTOR), and mTORC2, which contains RICTOR (Rapamycin-Insensitive Companion of TOR). In neurons, mTORC1 is mainly involved in translational control, mitochondrial function and autophagy

\*Correspondence: mlmontesinos@us.es

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología Médica Y Biofísica, Universidad de Sevilla,

Av. Sánchez-Pizjuán 4, 41009 Sevilla, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

regulation, whereas mTORC2 regulates actin cytoskeleton (for a review see [9]). It is well known that rapamycin blocks hippocampal mGluR-LTD [10], initially suggesting that protein synthesis mediated by mTORC1 is necessary for this plasticity. Nevertheless, chronic treatment or high concentrations of rapamycin also inhibit mTORC2 [11], and, moreover, it has been recently reported that mTORC2, but not mTORC1, is required for mGluR-LTD [12]. In line with these results, it is well established that inhibiting actin polymerization/depolymerization blocks mGluR-LTD [13] and that dendritic spines elongate in response to mGluR activation, correlating with AMPA receptor (AMPA) endocytosis [13, 14]. In fact, mGluR activation induces rapid local translation of proteins involved in AMPAR internalization such as Arc/Arg3.1 (Activity Regulated Cytoskeleton-associated protein), OPHN1 (oligophrenin-1), MAP1B (Microtubule Associated Protein 1B) and STEP (Striatal-Enriched Protein Phosphatase) [15]. These proteins are targets of FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein, encoded by the *FMR1* gene), a key regulator of local translation. Since mGluR-LTD is enhanced in *FMR1* knockout mice, it has been proposed that FMRP serves as a brake on mGluR-stimulated protein synthesis (for a review see [16]). Moreover, it has been shown that hippocampal mGluR-LTD requires the rapid synthesis and degradation of FMRP [17]. Despite the extensive work, the definitive comprehension of the signaling pathways that contribute to protein synthesis necessary for mGluR-LTD remains elusive although roles for mTORC1 and ERK (Extracellular signal-regulated kinase) have been proposed [16].

To gain insight into the signaling pathways relevant for synaptic plasticity altered in Ts1Cje, we have characterized the proteome of hippocampal SNs from wild-type (WT) and Ts1Cje mice by iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantitation). Interestingly, mitochondrial function, calcium signaling and, remarkably, synaptic plasticity pathways, including LTD, were predicted to be altered in trisomic mice. Accordingly, we have found that the hippocampal mGluR-LTD is enhanced in Ts1Cje animals. Additionally, we have evaluated the effect of rapamycin on dendritic spine density and morphology. We found that prenatal treatment with rapamycin did not recover the decreased density of dendritic spines in Ts1Cje offspring but, interestingly, recovered the alterations observed in mushroom spine size. Strikingly, prenatal rapamycin treatment also had a recovery effect on the mGluR-LTD in Ts1Cje hippocampus. Together, these results extend the evidence that supports the possible benefits of rapamycin for synaptic plasticity in the context of DS.

## Materials and methods

### Animals

Partial trisomic Ts1Cje mice [2] were purchased from Jackson Laboratories (RRID:IMSR\_JAX:004861) and, as recommended by the supplier, were maintained on a mixed genetic background for improving strain viability, by backcrossing Ts1Cje males to B6C3F1 hybrid females (supplied by Charles River, RRID:IMSR\_CRL:31). The Ts1Cje mice harbour two copies of the WT murine chromosome 16 (MMU16) and an additional copy of distal MMU16 (containing 96 genes) translocated onto MMU12 [2]. Sets of WT males and Ts1Cje littermates were used in the experiments. A total number of 48 animals (22 WT and 26 Ts1Cje) were used. No randomization was performed to allocate subjects in the study. Thus, they were arbitrarily allocated to the specific treatments or procedures. Blind animals homozygous for the retinal degeneration mutation *Pde6b*<sup>rd1</sup>, which segregates in the Ts1Cje colony [2], were not used. Experiments were carried out according to the European Union directive for the use of laboratory animals. All the protocols were approved by the Regional Government (Junta de Andalucía, Spain) Ethical Committee (Ref. No. 24/05/2016/097). This study was not pre-registered. Mice were housed in cages and subjected to a normal 12 h light–12 h dark cycle. In the case of adult and juvenile (P21–P30; P, post-natal day) mice, 4 animals per cage, with food and water ad libitum, were housed. P18 mice, used in Golgi experiments, were housed with their mother.

Animals were genotyped following the protocols recommended by Jackson Laboratories. For determining partial trisomy, the neomycin resistance generic primers oIMR0013 (5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC) and oIMR0014 (5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC), which generate a 280 bp NEO band (only present in trisomic mice), as well as the internal control *Tcrd* primers oIMR0015 (5'-CAAATGTTGCTTGTCTGGTG) and oIMR0015 (5'-GTCAGTCGAGTGCACAGTTT), which amplify a 200 bp fragment (both in trisomic and WT mice), were used in standard PCR reactions. For detecting the *Pde6b*<sup>rd1</sup> mutation, the oIMR2093 (mutant; 5'-AAGCTAGCTGCAGTAACGCCATTT), oIMR2094 (WT; 5'-ACCTGCATGTGAACCCAGTATTCTATC) and oIMR2095 (common; 5'-CTACAGCCCCTCTCC AAGGTTTATAG) primers were used in standard PCR reactions. These primers produce a 560 bp band in mutants, a 240 bp band in WT, and both in heterozygote animals.

Adult animals were sacrificed by cervical dislocation. P18–P30 animals, used for electrophysiology and Golgi staining experiments, were anaesthetized by intraperitoneal injection of 2% tribromoethanol (Sigma, Ref. T48402) at a dose of 300 mg/kg, and then decapitated.

Finally, P0 mice used for primary culture of neurons were directly decapitated.

#### Rapamycin treatment

Rapamycin (Selleckchem, Ref. S1039) was dissolved at 0.1 mg/ml in saline buffer containing 1 ethanol (Merck, Ref. 100983), 0.25% Tween<sup>®</sup>80 (Sigma-Aldrich, Ref. P4780) and 0.25% polyethylene glycol 400 (Aldrich, Ref. 202398) [18]. A single intraperitoneal injection of rapamycin (1 mg/kg) was applied to pregnant dams between E15 and E17 as previously described [18]. Control pregnant dams were not injected with vehicle.

#### Synaptoneurosomes preparation

SNs were prepared as previously described [19]. Briefly, hippocampi from adult WT or Ts1Cje mice (2–4 month old, 3 mice per group) were rapidly dissected and homogenized in 12 ml of homogenization solution consisting in: 10 mM Hepes (Sigma, Ref. H4034), pH 7.4; 320 mM sucrose (Sigma, Ref. S0389); 1.0 mM MgSO<sub>4</sub> (Sigma, Ref. M7506); protease inhibitors leupeptin (10 μM), aprotinin (2 μg/ml), and pepstatin (1 μM) (Sigma, Ref. L2884, A1153 and P5318, respectively), with a glass-teflon Dounce homogenizer. The homogenate was centrifuged (1000g for 10 min at 4 °C), and the pellet was subjected to an Optiprep discontinuous gradient (9–40% Optiprep; Sigma, Ref. D1556). After centrifugation (16,500g for 30 min at 4 °C), the material from the first band (fraction O1) was recovered and subjected to discontinuous Percoll (Sigma, Ref. P1644) gradient (10–25%) centrifugation (32,400g for 20 min at 4 °C). The material from the fourth band (fraction 1P4), which is highly enriched in SNs, was recovered, washed with buffer, rapidly frozen and stored at – 80 °C until iTRAQ proteomics.

#### iTRAQ labeling and analysis

Protein extraction, iTRAQ labeling and tandem mass spectrometry analysis was carried out at the Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) Proteomic Service. Briefly, synaptoneurosomal proteins were extracted using a lysis buffer that contained SDS, supplemented with protease inhibitors (Sigma, Ref. P8340), phosphatase inhibitor cocktails I and II (Sigma, Ref. P2850 and P5726), and benzonase (Sigma, Ref. E8263). After incubation for 1 h, the samples were centrifuged for 15 min at 14,000 rpm in a refrigerated bench-top microfuge. Proteins present in the supernatant were quantified following iTRAQ labeling (AB ScieX, Ref. 4390811) essentially following the manufacturer's instructions, omitting the protein precipitation step in order to conserve minority proteins. 50 μg of proteins were labeled for each experimental condition in duplicates. Data were analyzed using the Proteome Discoverer 1.4 software (Thermo), setting the

False Discovery Rate (FDR) of both proteins and peptides identification to be less than 0.01.

#### Proteomic analyses

To verify that SNs preparations used in iTRAQ experiments were enriched in synaptic proteins, a PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships; version 16.0) analysis was carried out [20]. An overrepresentation test was performed, selecting the entire *Mus musculus* genome (21,988 proteins) and the PANTHER GO-Slim Cellular Component annotation data set. Bonferroni correction for multiple testing was applied.

Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Fall release September 2019) was performed for both up- and downregulated proteins, considering a cutoff of 1.2-fold. This cutoff was established by analyzing the protein level variations observed in the WT sample replicate and determining the boundaries within the 80% best fitting replicate data.

The Ingenuity Knowledge Base (genes only) set was used as reference. All the molecules and/or relationships included in the analysis were experimentally observed, either in the mouse, rat, human nervous system tissue or neural (astrocytes or neurons) cells. The IPA software generates a list of significantly affected canonical pathways based on two parameters, the p-value and the Z-score. The p-value, calculated with the right-tailed Fisher Exact Test, is a measure of the probability that a particular pathway were enriched in the set of deregulated proteins due to random chance. To enhance the stringency of the analysis, we considered only pathways with a p-value ≤ 0.005 (i.e.,  $-\log_{10}(\text{p-value}) \geq 2.3$ ). Considering the protein level changes observed in the set of deregulated proteins, the canonical pathways identified are predicted to be either activated or inhibited applying the IPA Z-score algorithm. A positive Z-score value indicates that a pathway is predicted to be activated, and a negative Z-score indicates its inhibition. Canonical pathways which are not eligible for activity analysis by the IPA are marked as N/A.

#### Antibodies

We used anti-FMRP (Abcam; Ref. ab69815, RRID:AB\_1209562), anti-MAP2 (Merck Millipore; Ref. MAB378, RRID:AB\_94967), anti-LC3B (Cell Signaling; Ref. #2775, RRID:AB\_915950), and anti-TOMM20 (Novus; Ref. NBP1-81556, RRID:AB\_11003249) as primary antibodies, while horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit (Promega; Cat:W4011, RRID:AB\_430833), Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific; Cat# A-21429, RRID:AB\_2535850), and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (Thermo Fisher Scientific; Cat# A-11001, RRID:AB\_2534069) were used as secondary antibodies.

### Western blot

Western blots were performed as previously described [21]. Adult (4–5 month-old) male mice were used. Briefly, total hippocampal protein extracts were prepared for each individual by mechanical tissue homogenization in extraction buffer containing: 50 mM Tris (Sigma, Ref. 93352) buffer (pH 7.4), 0.5% Triton X-100 (Sigma, Ref. T8787), 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich, Ref. S7653), 1 mM EDTA (Sigma, Ref. E5134), 3% SDS (Sigma, Ref. 05030), protease (Sigma, Ref. P8340) and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma, Ref. P5726 and P0044). Protein extracts were resolved by SDS-PAGE on Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ precast gels (BioRad, Ref. 1704156). Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Trans-blot® Turbo™ Transfer Pack, Ref. 1704156). Membranes were incubated with blocking solution (1% non fat dry milk in TBS-T buffer; TBS-T buffer is 20 mM Tris buffer [pH 7.5], 150 mM NaCl, and 0.1% Tween®20) for 1 h at RT, then incubated overnight at 4 °C with the appropriate primary antibody (dilution 1:1,000). After washing with TBS-T, the membranes were incubated with the HRP-conjugated secondary antibodies diluted in blocking solution (dilution 1:20,000 for FMRP immunoblot, 1:5,000 for LC3B immunoblot, and 1:2,000 for TOMM20) for 1 h at RT. HRP-conjugated secondary antibodies were detected with the WesternBright Quantum HRP Substrate (Advanta, Ref. K-12042-D10) and chemiluminescence measured on a ChemiDoc XRS (BioRad) imager.

### Immunocytochemistry

Hippocampal cultures from P0 WT or Ts1Cje littermates were established as previously described [22]. Briefly, hippocampi from 5 WT and 5 Ts1Cje mice were dissected in HBSS medium (Gibco, Ref. 14175-095) and mechanically dissociated in DB1 culture medium (Biowest, Ref. L0104) after treatment with 0.2% trypsin (Gibco, Ref. 15090-046) for 10 min. Cells were cultured in Neurobasal A (Gibco, Ref. 100888-022) supplemented with B27 (Gibco, Ref. 17504-044), Glutamax (Gibco, Ref. 35050-061) and penicillin/streptomycin (Gibco, Ref. 15140-122). To inhibit glial growth, 0.3 mM 5-fluoro-2'-deoxyuridine (Sigma-Aldrich, Ref. 856657) and 0.8 mM uridine (Sigma-Aldrich, Ref. U3003) were added after 48 h in culture. After 14 days in vitro (DIV), cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich, Ref. P6148) in phosphate-buffered saline (PBS, Panreac Applichem, Ref. A9177) and subjected to dual immunocytochemistry using antibodies against FMRP (1:250 dilution) and MAP2 (1:1,000 dilution). Thus, after fixation, cells were washed 3 times with PBS and incubated with blocking solution (0.1% Triton X-100, and 10% fetal bovine serum in PBS) for 1 h at RT. Then, primary antibodies, diluted in

blocking solution, were applied overnight at 4 °C. After washing 3 times with PBS for 10 min, cells were incubated with the corresponding secondary antibodies (dilution 1:1,000) for 1 h at RT, then washed in PBS. Confocal microscopy images were acquired and processed as previously described [21]. The mean pixel intensity for the corresponding immunofluorescent FMRP signal in dendrites was determined (in arbitrary units, a.u.) using a Matlab (Mathworks) routine previously established [3].

### Electrophysiological recordings

Hippocampal slices were prepared from P21–P30 WT and Ts1Cje mice. Since we intended to correlate electrophysiological and behavioural results, and previous behavioural experiments performed in the laboratory gave a high variability when using females, only male mice were used, for the sake of reproducibility. Mice were anesthetized and brains were removed in an ice-cold artificial cerebrospinal fluid with partial substitution of Na with sucrose (ACSFs) with constant flux of carbogen (5% CO<sub>2</sub>; rest O<sub>2</sub>; H<sub>2</sub>O < 5 ppm). ACSFs composition was: 2.5 mM KCl (Sigma, Ref. P9541); 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O) (Sigma, Ref. P71505); 26 mM NaHCO<sub>3</sub> (Sigma, Ref. S5761); 25 mM glucose (Sigma, Ref. G5400); 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> (2H<sub>2</sub>O) (Sigma, Ref. 223506); 4 mM MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O) (Sigma, Ref. 63138); 185 mM sucrose (Sigma, Ref. P84097). Brains were positioned in the cutting chamber over a thin film of ethyl cyanoacrylate and were submerged in cold ACSFs. 350 µm horizontal slices were obtained using a vibratome (Vibratome 3000, Sectioning System) and both hippocampi were isolated in each slice preserving entorhinal cortex adjacent to the hippocampal formation. Slices were incubated in ACSF (126 mM NaCl; 3 mM KCl; 1.3 mM MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O); 2 mM CaCl<sub>2</sub> (2H<sub>2</sub>O); 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O); 24 mM NaHCO<sub>3</sub>; 10 mM glucose) for 30 min at 34 °C. Then, slices were incubated for at least 2 h in ACSF at room temperature (RT; 22–25 °C) before recording, keeping constant the flux of carbogen. Slices were transferred to a 3D-MEA chamber (MultiChannel Systems, Ref. 60-3DMEA200/12/50iR-gr) and stayed at least 10 min before stimulation with a 2 ml/min flux rate of ACSF. All the registers were performed at RT. The experimenter was blind to the genotype and treatment of the animals during experimentation and data analysis.

The 3D-MEA devices have 59 conical TiN electrodes with 12 µm diameter (100 µm in the base of the electrode) and 50 µm high, distributed in an 8 × 8 matrix with an internal reference electrode at the position 15 (column 1, row 5). The inter-electrode distance is 200 µm. The isolation material used for these devices' circuitry is SiN and the base is made out of glass.



Slices were stimulated at the Schaffer collateral pathway in the CA1 region of hippocampus using a biphasic square pulse (negative phase-positive phase; 100 ms per phase) at 0.0167 Hz (1 stimulus per minute). Slices showing field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) amplitude lower than 100  $\mu$ V for test stimulation ( $-/+$  1750 mV) in the CA1 region were discarded. Input/output (I/O) curve was performed reaching the limits of the system (750–4000 mV; 3 stimuli per amplitude) and baseline was established at 60% of the highest response obtained at the maximum voltage applied. After baseline stabilization, 100  $\mu$ M (S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine (DHPG; Sigma-Aldrich, Ref. D-3689) in ACSF was bath applied at a flow rate of 2 ml/min for 5 min. DHPG-long term depression (DHPG-LTD) was recorded for 1 h after treatment. In order to determine the synaptic efficacy, the slope of the initial fEPSP curve was measured in the segment comprised between the 10–90% of the curve amplitude. Recordings were acquired at 10,000 Hz.

Electrophysiological results are presented as the mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean) normalized to the baseline slope mean. For statistical analysis, a Student's t-test was performed for compared experimental groups. Normalized slope at the minute 60 after DHPG treatment initiation was used for comparisons.

#### Golgi staining and spine morphology analysis

WT and Ts1Cje P18 mice were anesthetized and both hemispheres were separated, and the cerebellum was removed. A FD Rapid Golgi stain kit (FD NeuroTechnologies INC, Ref. PK401A) was used following the manufacturer guidelines. After the staining process, 100  $\mu$ m coronal slices were prepared using a cryostat (Leica CM1950). Slices were deposited over Menzel-Gläser Superfrost PLUS microscope slides (ThermoScientific, Ref. J1800AMNZ) and covered with a thin gelatine coat (Gelatine Gold; Panreac DC, Ref. 251336).

Secondary dendrites images were acquired from the hippocampal CA1 stratum radiatum region, at a  $1,600 \times 1,200$  pixel resolution, using an Olympus BX61 microscope (CellSens software). For spine morphology analysis, image acquisition was made using an UPlanSApo60x/1.35 oil objective, with a  $10\times$  ocular and an additional  $2\times$  magnification. For spine density analysis, images were acquired using an UPlanApo40x/0.85 air objective, with a  $10\times$  ocular, and an additional  $2\times$  magnification. To determine dendritic spine density, spines were manually counted, and the branch longitude was measured using ImageJ software. For spine morphology analysis, spines perimeters were manually defined, and the head diameter was measured using ImageJ software. The experimenter was blind to sample genotype and treatment during experiment and data analysis.

#### Statistical analysis

Predetermined sample calculation was not performed. Sample size was determined based on published studies in the field or in animal availability. The quantitative data are presented as the means and SEM. No test for outliers was performed. All data points were included. The GraphPad Prism software (version 5.00) was used. D'Agostino and Pearson omnibus normality test was first performed, in order to apply either a Student's t-test or a Mann–Whitney rank sum test for mean comparisons. p values are indicated through the text and figure legends.

#### Results

##### Proteomic analysis of hippocampal SNs from Ts1Cje mice

In a previous work we found that Ts1Cje mice showed impaired BDNF-LTP, which was restored by the mTOR inhibitor rapamycin [7]. In order to identify synaptic differences that could account for plasticity and memory deficits in Ts1Cje mice we performed a proteomic analysis of hippocampal SNs isolated from WT and Ts1Cje mice.

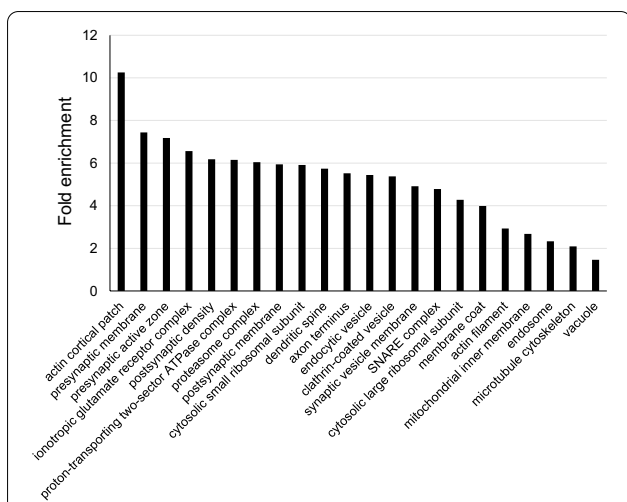
Protein samples were subjected iTRAQ proteomics. Thus, from each SNs sample, duplicates were labeled, and the relative amount of each detected protein was referenced to one of the WT samples (Additional file 1: Table S1). 1,890 proteins were identified by at least two unique peptides (Additional file 1: Table S2). Proteins not detected in all the samples (4 proteins) as well as technical replicates with  $CV\% > 30\%$  (19 proteins) were removed. The geometric mean of the relative protein amount was calculated (Additional file 1: Table S3) and used in the subsequent analysis by IPA software.

To verify that the detected proteins were mainly synaptic, the list of proteins in Additional file 1: Table S3 was subjected to a PANTHER overrepresentation test [20]. The PANTHER Go-Slim Cellular Component annotation dataset was selected. Thus, sets of related proteins overrepresented into the SNs, compared with the complete mouse genome, were identified. A high enrichment in pre- and post-synaptic proteins was evidenced (Fig. 1 and Additional file 1: Table S4), confirming the quality of the SNs preparations.

From the 1,867 proteins initially included in the IPA, 12 resulted to be unmapped, and from the 1,855 mapped identities, IPA considered 1,824 of them as “analysis-ready”.

Considering a 1.2-fold cutoff (see “Materials and methods”), 116 proteins were found to be deregulated (108 up- and 8 down-regulated) in Ts1Cje SNs compared to WT SNs (Additional file 2: Table S5).

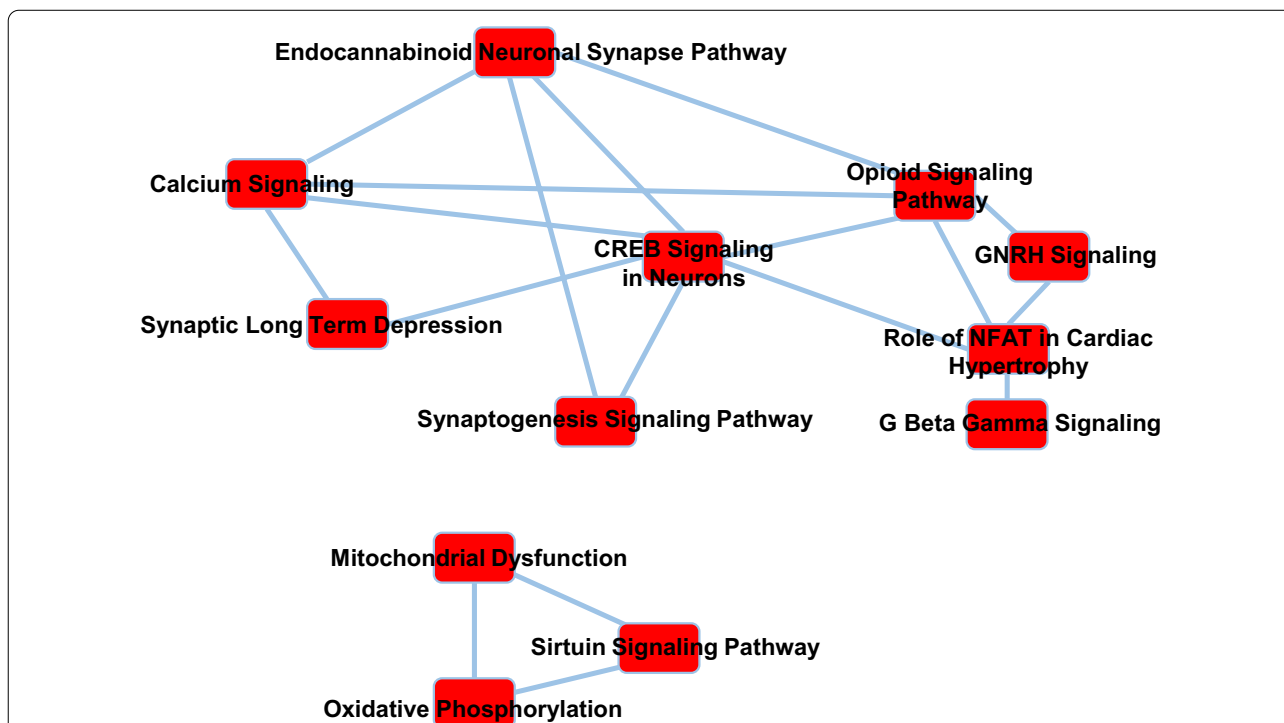
Attending to the Fischer p-value, IPA revealed that, the mitochondrial dysfunction canonical pathway, and the partially overlapping oxidative phosphorylation and



**Fig. 1** PANTHER overrepresentation test of proteins identified by iTRAQ in WT and Ts1Cje SNs. The cellular components overrepresented in SNs, compared to the complete mouse genome, are shown. For sake of clarity, only the most specific subclasses of the PANTHER Go-Slim Cellular Component annotation data set are included in the figure. Complete analysis is reported in Additional file 1: Table S4. The fold enrichment for each cellular component is indicated

sirtuin signaling pathways were among the most significantly enriched in the set of proteins affected in Ts1Cje SNs (Fig. 2, Table 1 and Additional file 2: Table S6). Accordingly, mitochondrial alterations have been described in DS and DS mouse models [23–25]. In fact, it has been recently shown that reduced autophagy/mitophagy due to mTOR hyperactivation produces damaged mitochondria accumulation in DS fibroblasts [26]. In agreement with these data, the levels of the B-II isoform of Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3B-II), a marker of autophagy, are also reduced in Ts1Cje hippocampus (Fig. 3A). Moreover, the levels of TOM20 (Translocase of Outer Mitochondrial membrane 20), a marker of mitochondrial mass, were increased in the Ts1Cje hippocampus (Fig. 3B).

Most important for the objectives of this work, we found that some key synaptic plasticity related pathways, including calcium signaling, CREB signaling, the endocannabinoid neuronal synapse pathway, the glutamate receptor signaling, and the synaptic LTD, were also significantly affected in Ts1Cje SNs (Fig. 2, Table 2 and Additional file 2: Table S6). In fact, the Z-score analysis of the data predicted increased activity of these pathways in Ts1Cje SNs (Additional file 2: Table S7).



**Fig. 2** Canonical IPA pathways affected in Ts1Cje SNs. The most significant canonical pathways identified by IPA among the altered proteins in Ts1Cje SNs are shown. Overlapping pathways sharing at least 7 proteins are connected by solid lines

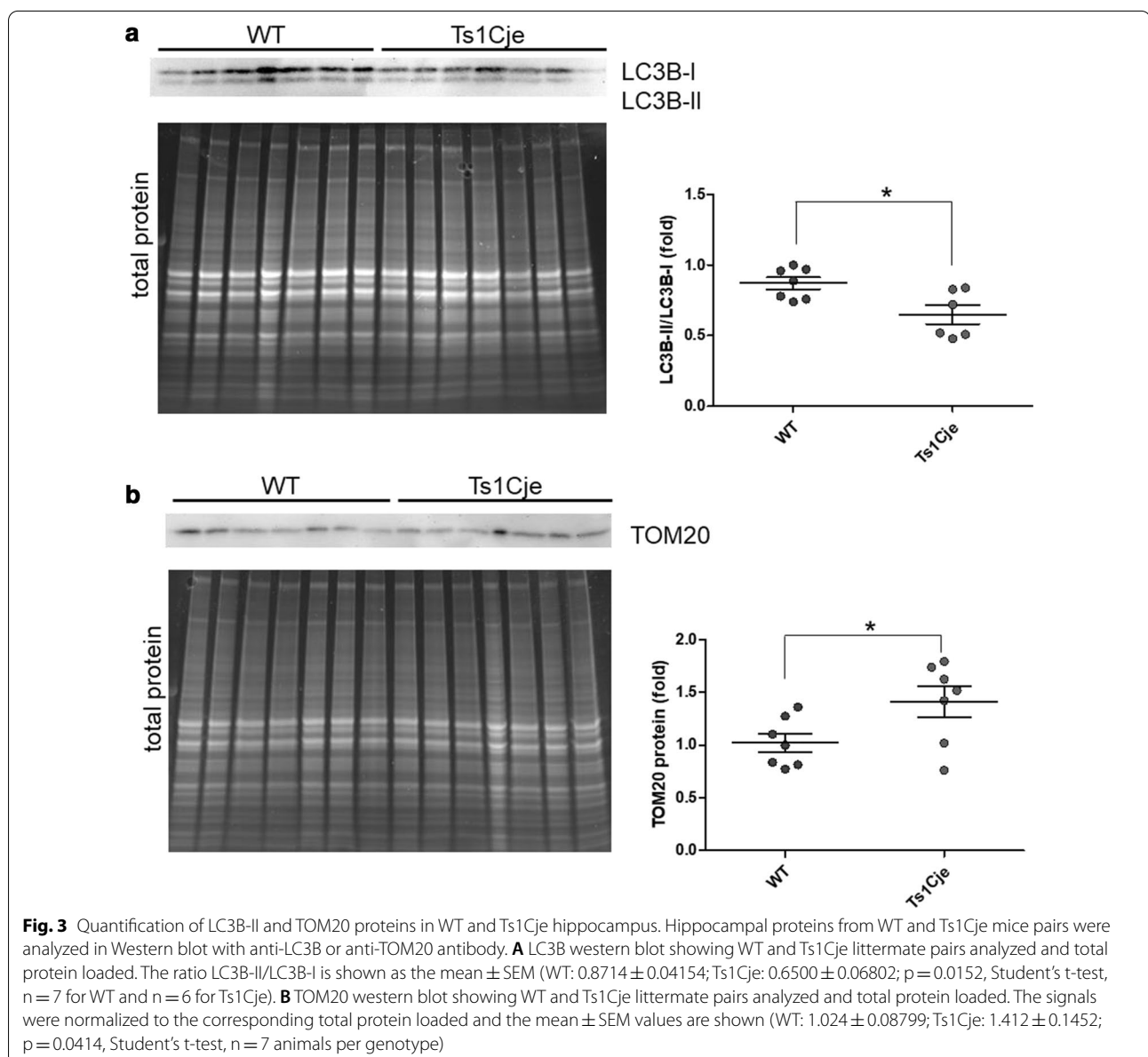
**Table 1** Proteins involved in mitochondrial pathways affected in Ts1Cje SNs

Symbol	Entrez gene name	ID	Ts1Cje	Pathway
APP	Amyloid beta precursor protein	P12023	1.246	Mitochondrial dysfunction Sirtuin signaling
ATP5MF	ATP synthase membrane subunit f	P56135	1.925	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation
ATP5PD	ATP synthase peripheral stalk subunit d	Q9DCX2	1.523	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation
ATP5PF	ATP synthase peripheral stalk subunit F6	P97450	1.907	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
COX4I1	Cytochrome c oxidase subunit 4I1	P19783	1.818	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation
COX5A	Cytochrome c oxidase subunit 5A	P12787	1.889	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation
Cox6c	Cytochrome c oxidase subunit 6C	Q9CPQ1	2.119	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation
CYC1	Cytochrome c1	Q9D0M3	1.728	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
CYCS	Cytochrome c, somatic	P62897	1.976	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation
GPD2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2	Q64521	1.549	Mitochondrial dysfunction
MAOB	Monoamine oxidase B	Q8BW75	1.235	Mitochondrial dysfunction
MT-CO2	Cytochrome c oxidase subunit II	P00405	2.804	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation
NDUFA2	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A2	Q9CQ75	1.337	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
NDUFA4	NDUFA4 mitochondrial complex associated	Q62425	1.331	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
NDUFA8	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A8	Q9DCJ5	1.546	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
NDUFAF1	NADH:ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 1	A2AQ17	1.359	Mitochondrial dysfunction Sirtuin signaling
NDUFS1	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S1	Q91VD9	1.813	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
NDUFS3	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S3	Q9DCT2	1.713	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
NDUFS6	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit S6	P52503	1.368	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
NDUFV2	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit V2	Q9D6J6	1.487	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling
SLC25A4	Solute carrier family 25 member 4	P48962	1.591	Sirtuin signaling
UQCRCB	Ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	Q9CQB4	1.928	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation
UQCRC1	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1	Q9CZ13	1.687	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation
UQCRCF1	Ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	Q9CR68	3.192	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation Sirtuin signaling

**Table 1** (continued)

Symbol	Entrez gene name	ID	Ts1Cje	Pathway
UQCRCQ	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex III subunit VII	Q9CQ69	2.522	Mitochondrial dysfunction Oxidative phosphorylation
VDAC1	Voltage dependent anion channel 1	Q60932	1.762	Mitochondrial dysfunction Sirtuin signaling
VDAC2	Voltage dependent anion channel 2	Q60930	2.043	Mitochondrial dysfunction Sirtuin signaling
WRN	Werner syndrome RecQ like helicase	O09053	− 1.341	Sirtuin signaling

The relative amounts (fold change, compared to WT SNs) of these proteins in Ts1Cje SNs are shown



**Table 2** Proteins involved in synaptic plasticity pathways affected in Ts1Cje SNs

Symbol	Entrez gene name	ID	Ts1Cje	Pathway
ADCY9	Adenylate cyclase 9	P51830	1.344	CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse
ATP2A2	ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> transporting 2	O55143	1.251	Calcium signaling
ATP2B1	ATPase plasma membrane Ca <sup>2+</sup> transporting 1	G5E829	1.329	Calcium signaling
ATP2B2	ATPase plasma membrane Ca <sup>2+</sup> transporting 2	F8WHB1	1.268	Calcium signaling
CACNA1A	Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A	P97445	1.314	Calcium signaling CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse Synaptic LTD
CACNA1G	Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 G	Q5SUF8	1.474	Calcium signaling CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse Synaptic LTD
CACNA2D1	Calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 1	O08532	1.262	Calcium signaling CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse Synaptic LTD
GNB2	G protein subunit beta 2	E9QKR0	1.207	CREB signaling
GNG2	G protein subunit gamma 2	P63213	– 1.212	CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse Glutamate receptor signaling
GRIA2	Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2	P23819	1.481	Calcium signaling CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse Glutamate receptor signaling Synaptic LTD
GRIA4	Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4	Q9Z2W8	– 1.251	Calcium signaling CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse Glutamate receptor signaling Synaptic LTD
GRIN1	Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1	A2A121	1.758	Calcium signaling CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse Glutamate receptor signaling
GRIN2B	Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B	Q01097	1.371	Calcium signaling CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse Glutamate receptor signaling
GRM5	Glutamate metabotropic receptor 5	Q3UVX5	1.200	CREB signaling Endocannabinoid neuronal synapse Glutamate receptor signaling Synaptic LTD
RAP2B	RAP2B, member of RAS oncogene family	P61226	1.300	Calcium signaling CREB signaling Synaptic LTD
RYR2	Ryanodine receptor 2	E9Q401	1.251	Calcium signaling Synaptic LTD

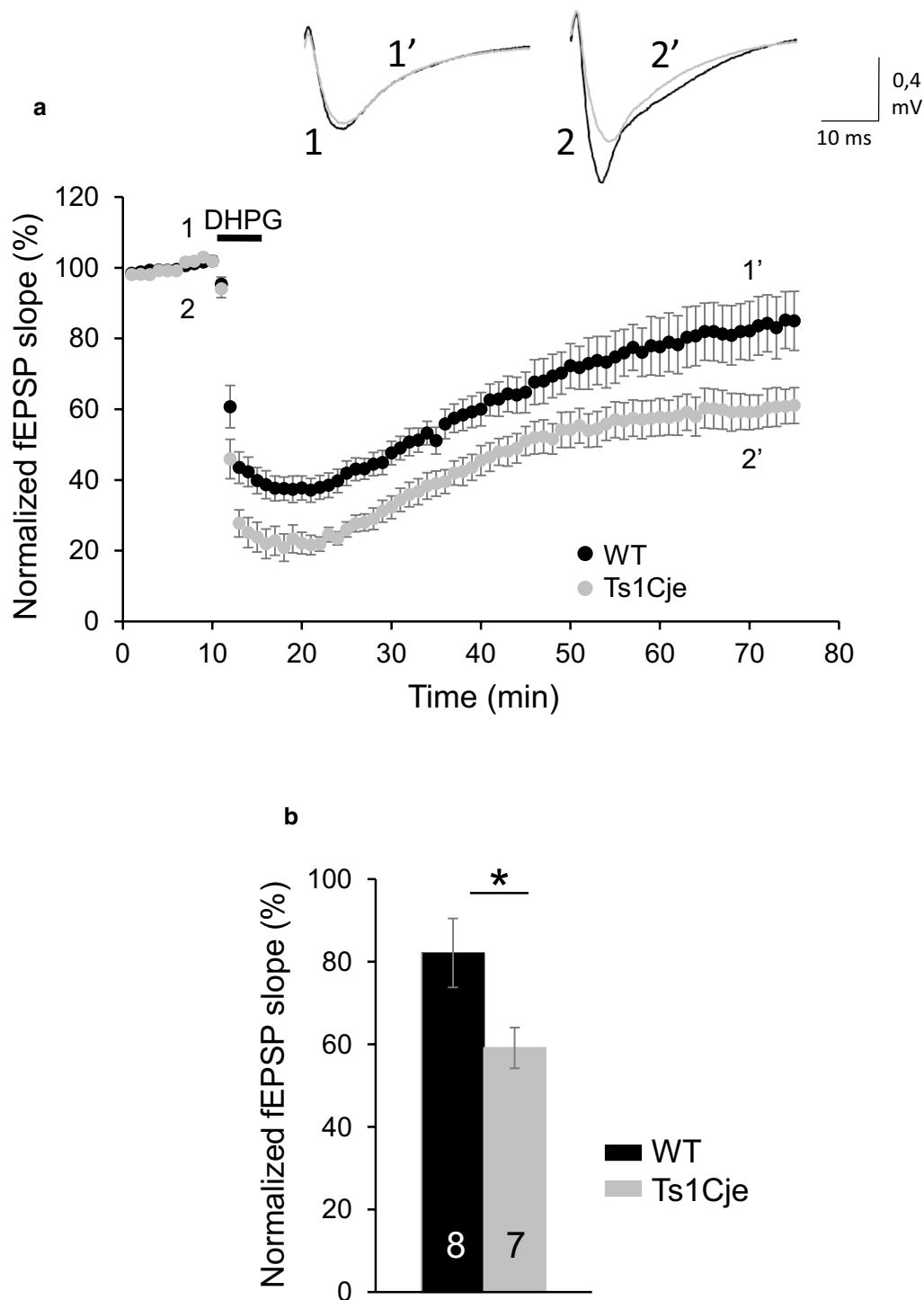
The relative amounts (fold change, compared to WT SNs) of these proteins in Ts1Cje SNs are shown

### mGluR-LTD is enhanced in the CA1 region of Ts1Cje hippocampus

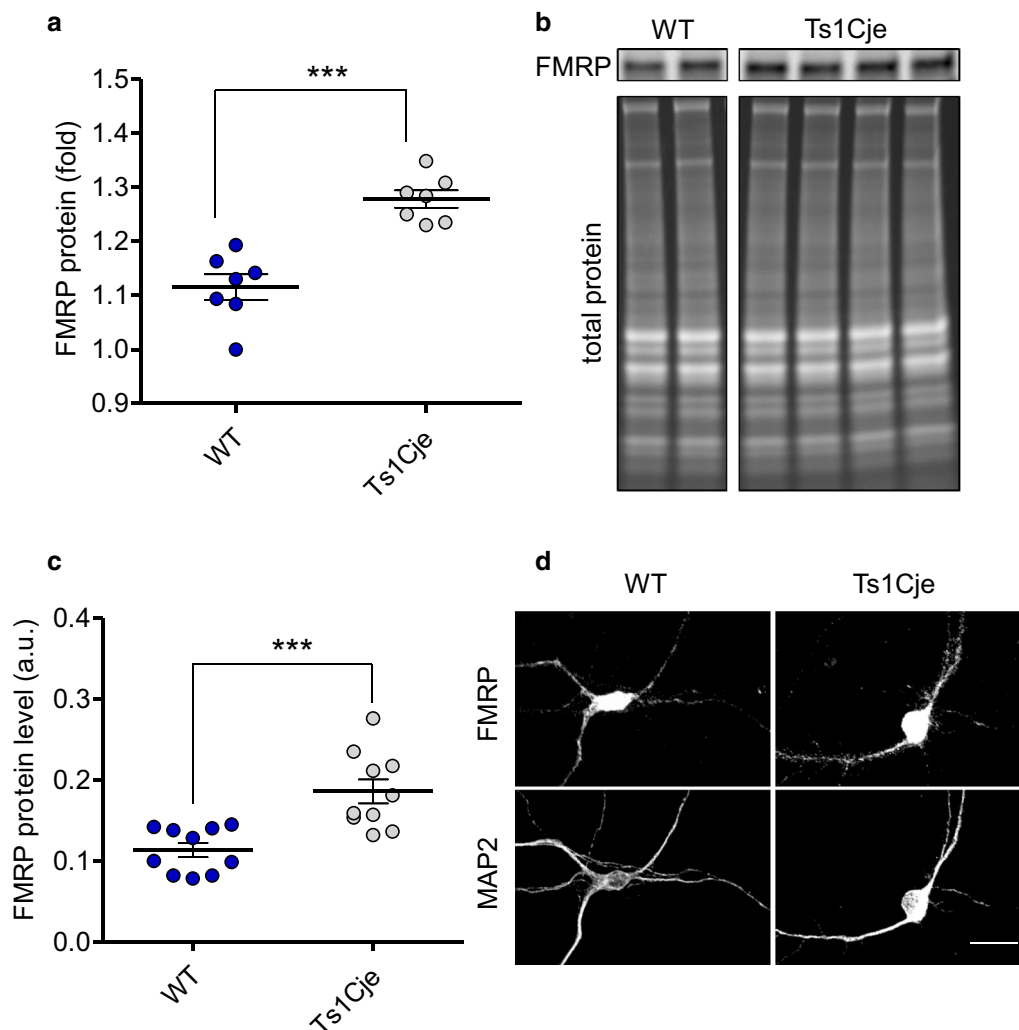
As mentioned above, the IPA analysis suggested that LTD is increased in the Ts1Cje hippocampus. It is well known that mTOR is involved in this type of plasticity [10, 12] and, remarkably, mTOR is hyperactivated in Ts1Cje

hippocampus [3]. These data stimulated us to evaluate mGluR-LTD in Ts1Cje mice.

mGluR-LTD is experimentally induced in hippocampal slices by a brief (5 min) exposure to DHPG, a specific agonist of mGluR1/5 receptors [8]. As expected, an LTD of evoked excitatory synaptic responses was evident in



**Fig. 4** mGluR-LTD in WT and Ts1Cje hippocampal slices. **A** Time course of DHPG effects on field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) in WT and Ts1Cje mice. Upper insets: representative traces of a fEPSP before (1, 2) and after (1', 2') DHPG application in WT (1, 1') and Ts1Cje (2, 2') mice. The mean fEPSP slopes before DHPG perfusion between WT and Ts1Cje mice were not different. **B** Quantification of the effects depicted in **A**. The error bars represent the SEM. The number of slices for each condition is indicated in the corresponding bar (WT: 8 slices from 4 mice; Ts1Cje: 7 slices from 3 mice).  $p = 0.039$  Student's t-test



**Fig. 5** Quantification of FMRP protein in WT and Ts1Cje hippocampus. **A** Hippocampal proteins from WT and Ts1Cje mice pairs were analyzed by Western blots with an anti-FMRP antibody. The signals were normalized to the corresponding total protein loaded and the mean  $\pm$  SEM values are shown (WT:  $1.115 \pm 0.0239$ ; Ts1Cje:  $1.278 \pm 0.0162$ ;  $p = 0.0006$ , Mann Whitney test,  $n = 7$  animals per genotype). **B** Representative Western blot showing two WT and four Ts1Cje littermate pairs (some lanes corresponding to non-littermate animals have been removed, but both WT and Ts1Cje panels correspond to the same Western blot experiment). **C** Quantification of the relative amount of FMRP protein in dendrites of WT and Ts1Cje hippocampal neurons at DIV14. The mean pixel intensity  $\pm$  SEM for FMRP immunofluorescence in dendrites is shown in arbitrary units (a.u.) ( $p = 0.0006$ , t test,  $n = 10$  images per genotype; each image typically contained one neuron). **D** Representative gray scale confocal images from the experiment in **C**, showing FMRP and MAP2 labeling in WT and Ts1Cje neurons. Scale bar = 20  $\mu$ m. Note that dendritic branching and length are reduced in Ts1Cje neurons, compared to WT controls (unpublished observations)

WT slices after DHPG exposure (Fig. 4,  $82.12 \pm 8.31\%$  of baseline,  $n = 8$  slices from 4 mice). Remarkably, an enhanced mGluR-LTD was elicited in Ts1Cje hippocampal slices (Fig. 4,  $59.12 \pm 4.92\%$  of baseline,  $n = 7$  slices from 3 mice). In conclusion, we found that mGluR-LTD was exaggerated in the Ts1Cje CA1 hippocampal region.

Enhanced mGluR-LTD is a hallmark of *FMR1* knock-out mice [27]. As already mentioned, FMRP (the *FMR1* encoded protein) is a repressor of local synthesis of proteins necessary for mGluR-LTD [28–30]. Thus, we

evaluated the amounts of FMRP in Ts1Cje hippocampus by Western blot and, strikingly, we found a slight, yet significant, increase of FMRP (Fig. 5). To evaluate more precisely the amount FMRP in the dendritic compartment, we performed double immunocytochemistry in primary cultures of hippocampal neurons at DIV 14 and measured the fluorescence level of FMRP labeling in MAP2-positive neurites (i.e., dendrites). As shown in Fig. 5, dendritic FMRP labeling was 1.6-fold higher in Ts1Cje neurons than in those from the WT. Hence, we must

**Table 3** Dendritic spine morphology comparison

Spine morphology	WT (n = 248)	Ts1Cje (n = 151)	WT RAPA (n = 143)	Ts1Cje RAPA (n = 635)
Filopodium	14.9	13.2	22.4	19.7
Stubby	27.8	29.8	25.2	26.5
Mushroom	57.3	57.0	52.4	53.9

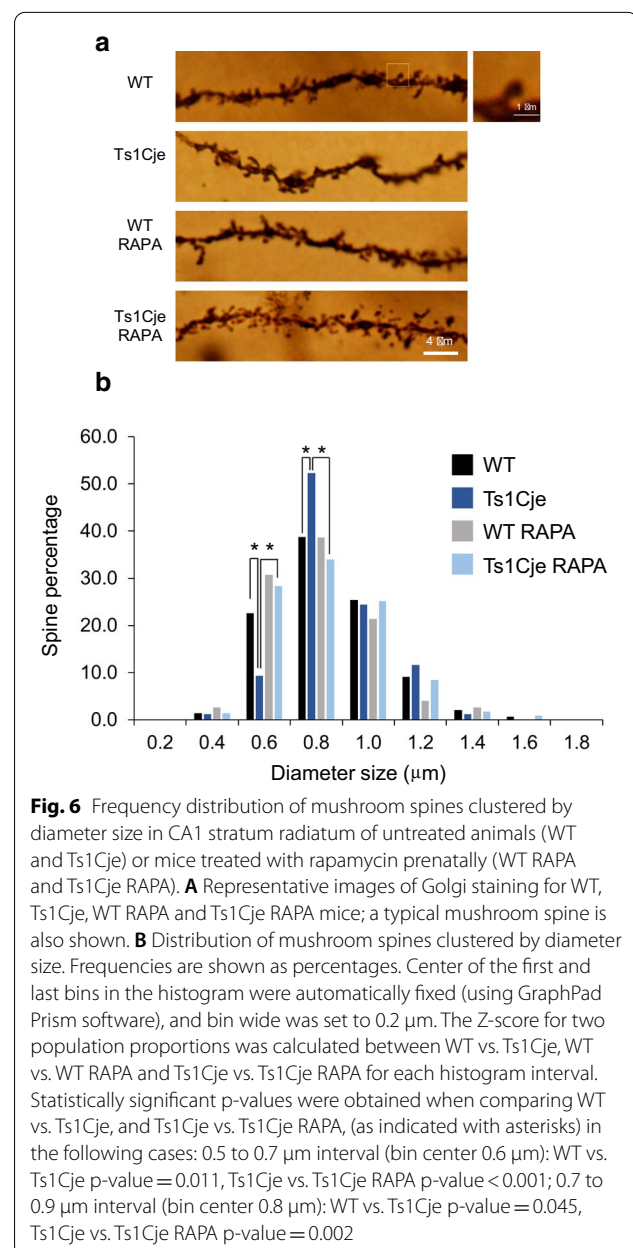
The percentages of filopodia, stubby and mushroom spines present in secondary dendrites of apical stratum radiatum CA1 neurons in WT, Ts1Cje, and prenatally rapamycin-treated WT and Ts1Cje mice are indicated. Number of mice used per condition was 2, except for WT RAPA (a single animal). Total number of spines (n) is also indicated for each experimental group

conclude that despite the higher levels of FMRP, mGluR-LTD was abnormally enhanced in Ts1Cje hippocampus.

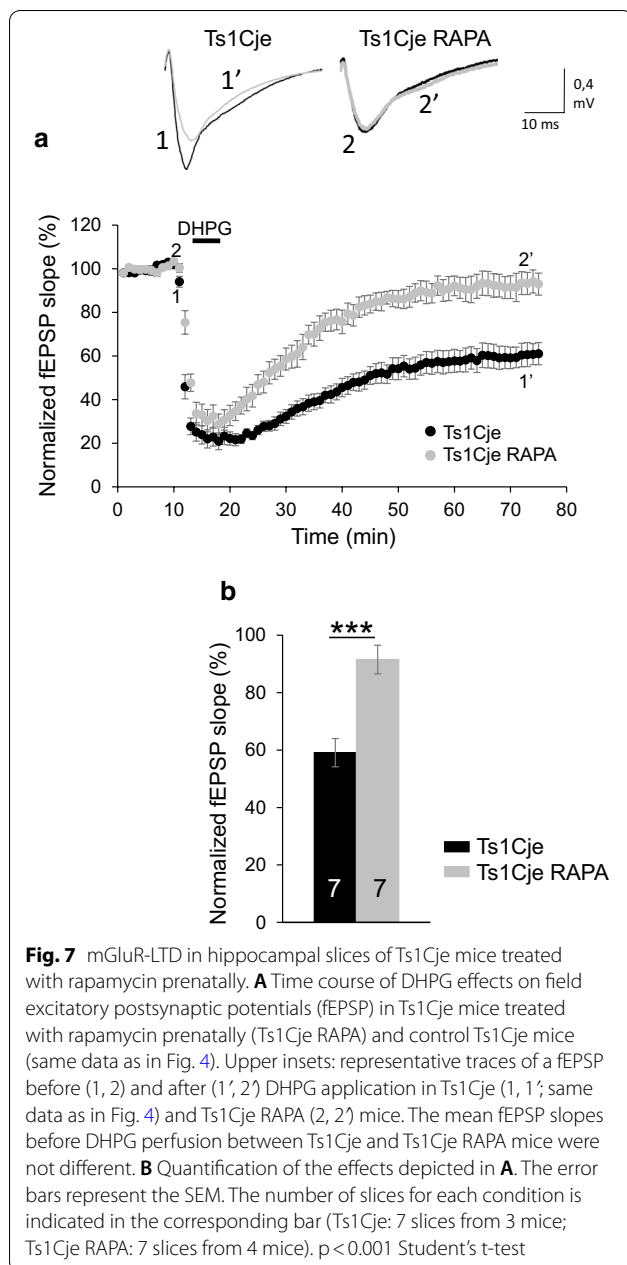
### Prenatal treatment with rapamycin normalizes size distribution of mushroom type dendritic spines in the stratum radiatum of Ts1Cje mice

It has been proposed that LTD is a physiological correlate of spine shrinkage [13, 31, 32]. Since dendritic spine alterations have been described in DS and DS mouse models including Ts1Cje [33–35], we decided to evaluate the effect of prenatal treatment with rapamycin on dendritic spine density in postnatal Ts1Cje mice using a rapid Golgi stain method (see “Materials and methods”). We observed a reduced spine density in secondary dendrites of CA1 stratum radiatum of untreated Ts1Cje animals, compared to WT controls (WT:  $0.640 \pm 0.031$  spines/ $\mu\text{m}$ ,  $n = 50$ ; Ts1Cje:  $0.523 \pm 0.035$  spines/ $\mu\text{m}$ ,  $n = 26$ ; t-Student test  $p$ -value = 0.015). However, prenatal treatment with rapamycin produced no significant effect on spine density in either group (WT RAPA:  $0.666 \pm 0.029$  spines/ $\mu\text{m}$ ,  $n = 27$ ; Ts1Cje RAPA:  $0.572 \pm 0.021$  spines/ $\mu\text{m}$ ,  $n = 31$ ).

It has been shown that the CA1 spines susceptible to undergo mGluR-LTD are large-head mushroom spines that contain endoplasmic reticulum (ER) and often harbor a spine apparatus, whereas spines without ER are refractory to this plasticity [36]. Thus, we decided to assess the proportion of filopodia, stubby and mushroom shape spines but we found no significant differences in the proportion of the different morphology categories among the experimental groups (Table 3). However, we found that the proportion of 0.5–0.7  $\mu\text{m}$  mushroom spines was significantly reduced in Ts1Cje animals, compared to WT, and recovered in Ts1Cje RAPA mice, whereas the percentage of 0.7–0.9  $\mu\text{m}$  mushroom spines was significantly increased in Ts1Cje mice and restored in Ts1Cje RAPA animals (Fig. 6 and Additional file 3: Table S8). Thus, prenatal treatment with rapamycin normalizes the size distribution of mushroom type dendritic spines in Ts1Cje stratum radiatum neurons.







### Prenatal treatment with rapamycin reduces mGluR-LTD in Ts1Cje hippocampus

In order to determine if the normalization of mushroom spine size distribution observed in Ts1Cje treated prenatally with rapamycin (Fig. 6) correlated with an effect on mGluR-LTD, we evaluated this plasticity in hippocampal slices of postnatal Ts1Cje mice treated prenatally with rapamycin (see “Materials and methods”). Remarkably, as shown in Fig. 7, mGluR-LTD was reduced in Ts1Cje RAPA mice ( $91.55 \pm 5.23\%$  of baseline,  $n = 7$  slices from 4

mice) compared to Ts1Cje, and showed values similar to those of WT.

### Discussion

We have previously shown that the mTOR pathway is hyperactivated in Ts1Cje hippocampus [3]. Afterwards, other groups reported mTOR hyperactivation in post-mortem DS brain [4, 5]. We have also found that rapamycin restored both BDNF-LTP and the persistence of LTM in the Barnes maze [7].

We have here presented the characterization of the Ts1Cje hippocampal synaptic proteome, and we have identified several affected pathways that could account for plasticity and/or memory deficits of Ts1Cje mice. Two main functions were predicted to be altered in Ts1Cje hippocampus: mitochondrial function and synaptic plasticity (including LTD).

Mitochondrial dysfunction and increased oxidative stress have been previously found in the Ts1Cje brain [37]. In fact, altered mitochondrial function has long been associated with DS [23–25]. It has been recently found damaged mitochondria linked to increased oxidative stress, reduced mitophagy and reduced autophagy, together with mTOR hyperactivation in fibroblasts from DS patients [26]. The role of mTORC1 as regulator of both general autophagy and mitophagy induction after oxidative phosphorylation uncoupling is well established [38]. Accordingly, pharmacological inhibition of mTOR using AZD8055, which inhibits both mTORC1 and mTORC2 [39], restored autophagy and mitophagy in DS fibroblasts [26]. As mentioned before, we previously demonstrated hyperactivation of mTOR in the Ts1Cje hippocampus [3]. Accordingly, we have here observed that autophagy is reduced, which could be related to the mitochondrial dysfunction that we detected in the proteomic analysis of Ts1Cje SNs, and to the increased levels of the mitochondrial mass marker TOM20 we measured in Ts1Cje adult hippocampus (Fig. 3).

Regarding synaptic plasticity, we found that mGluR-LTD is enhanced in Ts1Cje hippocampus. Many forms of synaptic plasticity have been characterized in the Ts1Cje and other DS mouse models [7, 35, 40]. mGluR-LTD has been previously studied in the Ts65Dn model but, in contrast to our results, a normal hippocampal mGluR-LTD, compared to WT, was found [41]. Nevertheless, there are important differences between the Ts65Dn and Ts1Cje models that could explain this apparent contradiction. Thus, additional DS non-related trisomic genes exist in Ts65Dn [42]. The fact that 6–8 month-old mice were used in the Scott-McKean and Costa study while we used P21–30 mice could also explain the different results since the mechanisms of mGluR-LTD seem to be developmentally regulated [43].

mGluR-LTD is triggered by activation of group I mGluR (i.e., mGluR1/5) and relies on protein translation [8]. Two main signaling cascades that regulate protein synthesis are engaged following mGluR1/5 stimulation: mTOR and ERK. Both pathways can stimulate cap-dependent translation at the initiation level. The relative contribution of these cascades to the protein synthesis necessary for mGluR-LTD is nevertheless unclear (for a review see [16]). Interestingly, it has been recently shown that mTORC2, but not mTORC1, is required for mGluR-LTD [12]. mTORC2 regulates actin cytoskeleton and, in fact, actin polymerization–depolymerization inhibition abolishes mGluR-LTD [13]. In any case, it seems clear that in wild-type conditions, rapid synthesis and degradation of FMRP is necessary for mGluR-LTD [17], which leads to transient local translation of key proteins involved in AMPAR internalization (i.e. GluA1 endocytosis), such as Arc/Arg3.1 [28, 30, 44]. Thus, after mGluR1/5 stimulation, FMRP is rapidly (<1 min) dephosphorylated by protein phosphatase 2A, and then (1–5 min) re-phosphorylated by p70S6K [45], a kinase that belongs to the mTOR pathway. Dephosphorylated FMRP is associated with polyribosomes, and phosphorylated FMRP with stalled (non-translating) ribosomes [46]. Thus, the short period after mGluR1/5 in which FMRP is dephosphorylated permits the translation of the FMRP-regulated proteins involved in mGluR-LTD [45].

Remarkably, and similarly to our results in Ts1Cje mice, it is well established that mGluR-LTD is exaggerated in FMRP knockout (KO) mice [27], a model for Fragile X. However, Fragile X is due to loss of expression of FMRP and, in contrast, we found higher levels of FMRP in the Ts1Cje hippocampus, strongly suggesting a different cause for the enhanced hippocampal mGluR-LTD in trisomic mice. From the list of proteomic changes involved in LTD identified in Ts1Cje SNs, the increased level of mGluR5 (indicated as GMR5 in Table 2) is of particular interest, since it is the main receptor that mediates mGluR-LTD. Thus, the 1.2-fold increase of mGluR5 in Ts1Cje SNs we detected could collaborate to the exaggerated mGluR-LTD we observed. On the other hand, it has been shown that the spines susceptible to undergo mGluR-LTD in the CA1 constitute a particular subpopulation of large-head mushroom spines with ER and spine apparatus, whereas spines without ER are refractory to mGluR-LTD [36]. We have here shown that the percentage of mushroom spines with a 0.7–0.9  $\mu\text{m}$  size was notably increased in Ts1Cje CA1 dendrites, compared to WT (Fig. 5). Although we are not sure if this subpopulation corresponds to that described in ref. [36], it is tempting to speculate that exaggerated mGluR-LTD in Ts1Cje hippocampus could be due to a higher proportion of ER-containing spines, susceptible to undergo mGluR-LTD.

Excitingly, rapamycin treatment of pregnant dams normalized the referred mushroom spine phenotype and reduced the mGluR-LTD in the Ts1Cje offspring.

mGluR stimulation leads to local inositol trisphosphate (IP3) receptor activation and calcium release from the ER [36]. Moreover, ryanodine receptors (RyRs) are particularly abundant in the spine apparatus [47], an ER membrane specialization of stacked discs, which plays roles in local translation and calcium signaling [48]. mGluR-LTD induces trafficking from the ER to the synapse of GluA2, an AMPAR subunit that renders the receptor impermeable to calcium. This trafficking depends on IP3 and RyR-mediated calcium release, and translation [49, 50]. Interestingly, IPA of the Ts1Cje hippocampal SNs proteomic data predicted increased calcium signaling due to higher levels of RyR2, glutamate receptor subunits (including GluA2, GluA4, GluN1, GluN2B), plasma membrane calcium ATPases, and calcium voltage-gated channel subunits (Table 2). We think that the increased levels of these proteins could be a consequence of the higher percentage of the 0.7–0.9  $\mu\text{m}$  mushroom spines in Ts1Cje hippocampus. Interestingly, the morphology of dendritic spines appeared among the functions that IPA predicted to be affected in Ts1Cje (not shown), based on the altered expression of several proteins, including catenin alpha 2 (CTNNA2). Remarkably, it has been shown that the mutation of CTNNA2 induces spine elongation in hippocampal neurons [51]. Conversely, we hypothesize that the higher level of CTNNA2 we found in Ts1Cje SNs (Additional File 2: Table S5) could provoke spine enlargement. Nevertheless, it should be noted that adult animals were used for proteomics while juvenile mice were used for electrophysiology experiments and spine morphology assessment. Thus, these correlations should be taken with precaution.

In summary, the molecular mechanism behind the mushroom spine morphologic phenotype in Ts1Cje hippocampal dendrites is unknown. Nevertheless, since it is recovered by rapamycin, mTOR signaling should be involved. We have previously found increased levels of both phospho-S6 (Ser235/236), a readout of mTORC1, and phospho-Akt (Ser473), a readout of mTORC2, in dendrites of Ts1Cje hippocampal neurons [3]. Accordingly, either mTORC1 or mTORC2 (or both) could be involved. Interestingly, RICTOR, a canonical component of mTORC2, interacts with Tiam1, a Rac-1 specific guanine nucleotide exchange factor, to regulate actin polymerization [52]. Tiam1 is encoded in the human chromosome 21 and it is in trisomy in Ts1Cje mice. Thus, Tiam1 overexpression in addition to mTORC2 hyperactivation could be relevant for the spine phenotype.

In conclusion, we have here shown abnormal, exaggerated hippocampal mGluR-LTD in Ts1Cje mice, which correlates with an increased proportion of 0.7–0.9  $\mu\text{m}$  mushroom spines in CA1 dendrites. Although the

precise molecular/cellular mechanisms for these phenotypes remain to be elucidated, prenatal treatment with rapamycin restored both morphologic and functional phenotypes, highlighting the therapeutic potential of rapamycin/rapalogs for correcting synaptic defaults in DS.

### Abbreviations

ACSFs: Artificial cerebrospinal fluid with partial substitution of Na with sucrose; AMPAR: AMPA receptor; Arc/Arg3.1: Activity Regulated Cytoskeleton-associated protein; a.u.: Arbitrary units; BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor; CTNNA2: Catenin alpha 2; DHPG: (S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine; DIV: Days in vitro; DS: Down syndrome; ER: Endoplasmic reticulum; ERK: Extracellular signal-regulated kinase; FDR: False Discovery Rate; fEPSP: Field excitatory post-synaptic potential; FMRP: Fragile X mental retardation protein; IP: Inositol tris-phosphate; IPA: Ingenuity Pathway Analysis; iTRAQ: Isobaric tag for relative and absolute quantitation; KO: Knockout; LC3B-II: Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3; LTD: Long term depression; LTM: Long-term memory; LTP: Long-Term Potentiation; MAP1B: Microtubule Associated Protein 1B; mGluR-LTD: Metabotropic Glutamate Receptor-Long Term Depression; MMU: Murine chromosome; mTOR: Mammalian target of rapamycin; N/A: Not applicable; NEO: Neomycine; OPHN1: Oligophrenin-1; P: Postnatal day; PANTHER: Protein Analysis Through Evolutionary Relationships; PBS: Phosphate-buffered saline; PFA: Paraformaldehyde; PVDF: Polyvinylidene difluoride; RAPTOR: Regulatory Associated Protein of mTOR; RICTOR: Rapamycin-Insensitive Companion of TOR; RRID: Research Resource Identifier; RT: Room temperature; RyRs: Ryanodine receptors; SEM: Standard error of the mean; SNs: Synaptoneuroosomes; STEP: Striatal-Enriched Protein Phosphatase; TOM20: Translocase of Outer Mitochondrial membrane 20; WT: Wild-type.

### Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13041-021-00795-6>.

**Additional file 1: Table S1.** List of proteins detected by tandem mass spectrometry iTRAQ in technical duplicates of WT and Ts1Cje synaptoneuroosomes (SNs). Quantification is referred to one of the WT samples. **Table S2.** Same data as in Table S1 after elimination of proteins identified by only one unique peptide. **Table S3.** Geometric mean of the relative protein amount in Ts1Cje SNs, after elimination from Table S2 of proteins not detected in all the samples, as well as technical replicates with CV% > 30%. **Table S4.** Complete hierarchy of PANTHER Go-Slim Cellular Component proteins overrepresented and underrepresented in WT and Ts1Cje SNs.

**Additional file 2: Table S5.** List of proteins affected in Ts1Cje SNs. **Table S6.** List of canonical pathways affected in Ts1Cje SNs. **Table S7.** Z-score analysis of canonical pathways in Ts1Cje SNs.

**Additional file 3: Table S8.** Number of spines belonging to each category (size) included in Fig. 6.

### Acknowledgements

We thank Mariló Pastor (IBIS Proteomics Service; Instituto de Biomedicina de Sevilla, Spain) for technical help and advice, the Supercomputing and Bioinnovation Center (Universidad de Málaga, Spain) for providing us with access to the IPA tool, and Francisco J. Tejedor for critically reading the manuscript.

### Authors' contributions

JDU performed, analysed and designed electrophysiologic experiments, performed spine morphology analysis and western blot experiments, and isolated synaptoneuroosomes for proteomics. JJC performed and analysed western blot and immunocytochemistry experiments, and isolated synaptoneuroosomes for proteomics. IB performed western blot and helped with rapamycin treatments and Golgi staining. MLM designed research, performed

and analysed western blot experiments, analysed proteomic data and wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

### Funding

This work was funded by the Junta de Andalucía (Spain, Grant P12-CTS-1818), the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (Spain, Grant: SAF2015-65032-R), the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and the Fondation Jérôme Lejeune (France).

### Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article and its additional information files. A preprint of this manuscript, including datasets, is available at: <https://doi.org/10.1101/2020.04.08.032029>.

### Declarations

#### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Author details

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología Médica Y Biofísica, Universidad de Sevilla, Av. Sánchez-Pizjuán 4, 41009 Sevilla, Spain. <sup>2</sup>Instituto de Biomedicina de Sevilla, IBIS/Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain. <sup>3</sup>Servicio de Animalario, Hospital Universitario Virgen Macarena (HUVVM), 41009 Sevilla, Spain.

Received: 9 December 2020 Accepted: 18 May 2021

Published online: 25 May 2021

### References

- Pennington BF, Moon J, Edgin J, Stedron J, Nadel L. The neuropsychology of Down syndrome: evidence for hippocampal dysfunction. *Child Dev.* 2003;74:75–93.
- Sago H, Carlson EJ, Smith DJ, Kilbridge J, Rubin EM, Mobley WC, et al. Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:6256–61.
- Troca-Marin JA, Alves-Sampaio A, Montesinos ML. An increase in basal BDNF provokes hyperactivation of the Akt-mammalian target of rapamycin pathway and deregulation of local dendritic translation in a mouse model of Down's syndrome. *J Neurosci.* 2011;31:9445–55.
- Iyer AM, van Scheppingen J, Milenkovic I, Anink JJ, Adle-Biassette H, Kovacs GG, et al. mTOR Hyperactivation in down syndrome hippocampus appears early during development. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2014;73:671–83.
- Perluigi M, Pupo G, Tramutola A, Cini C, Coccia R, Barone E, et al. Neuropathological role of PI3K/Akt/mTOR axis in Down syndrome brain. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842:1144–53.
- Troca-Marin JA, Casañas JJ, Benito I, Montesinos ML. The Akt–mTOR pathway in Down's syndrome: the potential use of rapamycin/rapalogs for treating cognitive deficits. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2014;13:34–40.
- Andrade-Talavera Y, Benito I, Casañas JJ, Rodríguez-Moreno A, Montesinos ML. Rapamycin restores BDNF-LTP and the persistence of long-term memory in a model of Down's syndrome. *Neurobiol Dis.* 2015;82:516–25.
- Huber KM, Kayser MS, Bear MF. Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science.* 2000;288:1254–7.
- Costa-Mattioli M, Monteggia LM. mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci.* 2013;16:1537–43.
- Hou L, Klann E. Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic

- glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci*. 2004;24:6352–61.
11. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*. 2006;22:159–68.
  12. Zhu PJ, Chen CJ, Mays J, Stoica L, Costa-Mattioli M. mTORC2, but not mTORC1, is required for hippocampal mGluR-LTD and associated behaviors. *Nat Neurosci*. 2018;21:799–802.
  13. Zhou Z, Hu J, Passafaro M, Xie W, Jia Z. GluA2 (GluR2) regulates metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression through N-cadherin-dependent and cofilin-mediated actin reorganization. *J Neurosci*. 2011;31:819–33.
  14. Vanderklish PW, Edelman GM. Dendritic spines elongate after stimulation of group 1 metabotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:1639–44.
  15. Luscher C, Huber KM. Group 1 mGluR-dependent synaptic long-term depression: mechanisms and implications for circuitry and disease. *Neuron*. 2010;65:445–59.
  16. Bhakar AL, Dolen G, Bear MF. The pathophysiology of fragile X (and what it teaches us about synapses). *Annu Rev Neurosci*. 2012;35:417–43.
  17. Hou L, Antion MD, Hu D, Spencer CM, Paylor R, Klann E. Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. *Neuron*. 2006;51:441–54.
  18. Tsai PT, Greene-Colozzi E, Goto J, Anderl S, Kwiatkowski DJ, Sahin M. Prenatal rapamycin results in early and late behavioral abnormalities in wildtype C57BL/6 mice. *Behav Genet*. 2013;43:51–9.
  19. Troca-Marin JA, Alves-Sampaio A, Tejedor FJ, Montesinos ML. Local translation of dendritic RhoA revealed by an improved synaptoneurosome preparation. *Mol Cell Neurosci*. 2010;43:308–14.
  20. Mi H, Ebert D, Muruganujan A, Mills C, Albu L, Mushayamaha T, Thomas PD. PANTHER version 16: a revised family classification, tree-based classification tool, enhancer regions and extensive API. *Nucl Acids Res*. 2020;49:D394–403.
  21. Casañas JJ, Gonzalez-Corales M, Urbano-Gomez JD, Alves-Sampaio A, Troca-Marin JA, Montesinos ML. CPEB1 is overexpressed in neurons derived from Down syndrome iPSCs and in the hippocampus of the mouse model Ts1Cje. *Mol Cell Neurosci*. 2019;95:79–85.
  22. Alves-Sampaio A, Troca-Marin JA, Montesinos ML. NMDA-mediated regulation of DSCAM dendritic local translation is lost in a mouse model of Down's syndrome. *J Neurosci*. 2010;30:13537–48.
  23. Valentí D, Braidy N, De Rasmó D, et al. Mitochondria as pharmacological targets in Down syndrome. *Free Radic Biol Med*. 2018;114:69–83.
  24. Valentí D, de Bari L, De Filippis B, Henrion-Caude A, Vacca RA. Mitochondrial dysfunction as a central actor in intellectual disability-related diseases: an overview of Down syndrome, autism, Fragile X and Rett syndrome. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;46(Pt 2):202–17.
  25. Izzo A, Mollo N, Nitti M, Paladino S, Cali G, Genesio R, et al. Mitochondrial dysfunction in Down syndrome: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Mol Med*. 2018;24:2.
  26. Bordi M, Darji S, Sato Y, Mellén M, Berg MJ, Kumar A, et al. mTOR hyperactivation in Down Syndrome underlies deficits in autophagy induction, autophagosome formation, and mitophagy. *Cell Death Dis*. 2019;10:563.
  27. Nosyreva ED, Huber KM. Metabotropic receptor-dependent long-term depression persists in the absence of protein synthesis in the mouse model of fragile X syndrome. *J Neurophysiol*. 2006;95:3291–5.
  28. Park S, Park JM, Kim S, Kim JA, Shepherd JD, Smith-Hicks CL, et al. Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of Arc/Arg3.1 essential for mGluR-LTD. *Neuron*. 2008;59:70–83.
  29. Nadif Kasri N, Nakano-Kobayashi A, Van Aelst L. Rapid synthesis of the X-linked mental retardation protein OPHN1 mediates mGluR-dependent LTD through interaction with the endocytic machinery. *Neuron*. 2001;72:300–15.
  30. Niere F, Wilkerson JR, Huber KM. Evidence for a fragile X mental retardation protein-mediated translational switch in metabotropic glutamate receptor-triggered Arc translation and long-term depression. *J Neurosci*. 2012;32:5924–36.
  31. Nagerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB, Bonhoeffer T. Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*. 2004;44:759–67.
  32. Sheng M, Ertürk A. Long-term depression: a cell biological view. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369:20130138.
  33. Benavides-Piccione R, Ballesteros-Yanez I, de Lagran MM, Elston G, Estivill X, Fillat C, et al. On dendrites in Down syndrome and DS murine models: a spiny way to learn. *Prog Neurobiol*. 2004;74:111–26.
  34. Belichenko PV, Masliah E, Kleschevnikov AM, Villar AJ, Epstein CJ, Salehi A, et al. Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of Down Syndrome. *J Comp Neurol*. 2004;480:281–98.
  35. Belichenko PV, Kleschevnikov AM, Salehi A, Epstein CJ, Mobley WC. Synaptic and cognitive abnormalities in mouse models of Down syndrome: exploring genotype-phenotype relationships. *J Comp Neurol*. 2007;504:329–45.
  36. Holbro N, Grunditz A, Oertner TG. Differential distribution of endoplasmic reticulum controls metabotropic signaling and plasticity at hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:15055–60.
  37. Shukkur EA, Shimohata A, Akagi T, et al. Mitochondrial dysfunction and tau hyperphosphorylation in Ts1Cje, a mouse model for Down syndrome. *Hum Mol Genet*. 2006;15:2752–62.
  38. Bartolome A, Garcia-Aguilar A, Asahara SI, Kido Y, Guillen C, Pajvani UB, et al. mTORC1 regulates both general autophagy and mitophagy induction after oxidative phosphorylation uncoupling. *Mol Cell Biol*. 2017;37:e00441-17.
  39. Chresta CM, Davies BR, Hickson I, et al. AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res*. 2010;70:288–98.
  40. Siarey RJ, Villar AJ, Epstein CJ, Galdzicki Z. Abnormal synaptic plasticity in the Ts1Cje segmental trisomy 16 mouse model of Down syndrome. *Neuropharmacology*. 2005;49:122–8.
  41. Scott-McKean JJ, Costa AC. Exaggerated NMDA mediated LTD in a mouse model of Down syndrome and pharmacological rescuing by memantine. *Learn Mem*. 2011;18:774–8.
  42. Duchon A, Raveau M, Chevalier C, Nalesso V, Sharp AJ, Herault Y. Identification of the translocation breakpoints in the Ts65Dn and Ts1Cje mouse lines: relevance for modeling Down syndrome. *Mamm Genome*. 2011;22:674–84.
  43. Moulton PR, Correa SA, Collingridge GL, Fitzjohn SM, Bashir ZI. Co-activation of p38 mitogen-activated protein kinase and protein tyrosine phosphatase underlies metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Physiol*. 2008;586:2499–510.
  44. Waung MW, Pfeiffer BE, Nosyreva ED, Ronesi JA, Huber KM. Rapid translation of Arc/Arg3.1 selectively mediates mGluR-dependent LTD through persistent increases in AMPAR endocytosis rate. *Neuron*. 2008;59:84–97.
  45. Narayanan U, Nalavadi V, Nakamoto M, Pallas DC, Ceman S, Bassell GJ, Warren ST. FMRP phosphorylation reveals an immediate-early signaling pathway triggered by group I mGluR and mediated by PP2A. *J Neurosci*. 2007;27:14349–57.
  46. Ceman S, O'Donnell WT, Reed M, Patton S, Pohl J, Warren ST. Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Hum Mol Genet*. 2003;12:3295–305.
  47. Sharp AH, McPherson PS, Dawson TM, Aoki C, Campbell KP, Snyder SH. Differential immunohistochemical localization of inositol 1,4,5-trisphosphate- and ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> release channels in rat brain. *J Neurosci*. 1993;13:3051–63.
  48. Jedlicka P, Vlachos A, Schwarzacher SW, Deller T. A role for the spine apparatus in LTP and spatial learning. *Behav Brain Res*. 2008;192:12–9.
  49. Pick JE, Khatri L, Sathler MF, Ziff EB. mGluR long-term depression regulates GluA2 association with COPII vesicles and exit from the endoplasmic reticulum. *EMBO J*. 2017;36:232–44.
  50. Pick JE, Ziff EB. Regulation of AMPA receptor trafficking and exit from the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Neurosci*. 2018;91:3–9.
  51. Togashi H, Abe K, Mizoguchi A, Takaoka K, Chisaka O, Takeichi M. Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron*. 2002;35:77–89.
  52. Huang W, Zhu PJ, Zhang S, Zhou H, Stoica L, Galiano M, et al. mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory. *Nat Neurosci*. 2013;16:441–8.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

***ANEXO IV. Contribución en publicación “CPEB1 is overexpressed in neurons derived from Down syndrome iPSCs and in the hippocampus of the mouse model Ts1Cje”.***

CPEB1 is overexpressed in neurons derived from Down syndrome iPSCs and in the hippocampus of the mouse model Ts1Cje

**Juan José Casañas<sup>1,2</sup>, Macarena González-Corrales<sup>1,2</sup>, Jesús David Urbano-Gómez<sup>1,2</sup>, Alexandra Alves-Sampaio<sup>1</sup>, José Antonio Troca-Marín<sup>1</sup> and María Luz Montesinos<sup>\*1,2</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Universidad de Sevilla, Sevilla, SPAIN

<sup>2</sup>Instituto de Biomedicina de Sevilla, IBIS/Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, SPAIN

\*Corresponding autor: María Luz Montesinos, Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Universidad de Sevilla, Av. Sánchez-Pizjuán 4, E-41009 Sevilla, SPAIN. Telephone: (+34) 954 55 98 66; E-mail: [mlmontesinos@us.es](mailto:mlmontesinos@us.es)

Running title: *Increased levels of CPEB1 protein in Down syndrome*

**Keywords:**  $\alpha$ -CaMKII, CPEB1, dendritic mRNA, Down syndrome, MAP1B, Trisomy 21

**Abbreviations used:** a.u., arbitrary units;  $\alpha$ -CaMKII,  $\alpha$ -Calmodulin Kinase II; CPE, cytoplasmic polyadenylation element; CPEB1, Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein 1; DS, Down's syndrome; Dscam, Down syndrome cell adhesion molecule; HPRT, Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; HSA21, human chromosome 21; HBSS, Hanks' balanced salt solution; iPSC, induced pluripotent stem cell; MAP1B, Microtubule-associated protein 1B; MAP2, Microtubule-associated protein 2; NMDAR, N-methyl-D-aspartate receptor; NSC, neural stem cell; PBS, phosphate buffered saline; PFA, paraformaldehyde; PTFE, polytetrafluoroethylene; SnrpN, Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N; UTR, untranslated region; WT, wild type.

## ABSTRACT

Trisomy 21, also known as Down syndrome (DS), is the most frequent genetic cause of intellectual impairment. In mouse models of DS, deficits in hippocampal synaptic plasticity have been observed, in conjunction with alterations to local dendritic translation that are likely to influence plasticity, learning and memory. Here we show that expression of a local translational regulator, the Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein 1 (CPEB1), is enhanced in hippocampal neurons from the Ts1Cje DS mouse model. Interestingly, this protein, which is also involved in dendritic mRNA transport, is overexpressed in dendrites of neurons derived from DS human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). Moreover, there is an increase in the mRNA levels of  *$\alpha$ -Calmodulin Kinase II ( $\alpha$ -CaMKII)* and *Microtubule-associated protein 1B (MAP1B)*, two dendritic mRNAs, in Ts1Cje synaptoneurosomes. Taking into account the fundamental role of CPEB1 protein and its target mRNAs in synaptic plasticity, these data could be relevant to the intellectual impairment in the context of DS.

## INTRODUCTION

*In situ* translation of dendritic mRNAs has a crucial influence on dendrite morphogenesis and the modulation of synaptic efficacy. The transport of these transcripts into dendrites is mediated by RNA binding proteins that recognize specific sequences or secondary structures that are frequently located at their 5' or 3' untranslated regions (UTRs) (Hutten et al., 2014). One of the best-characterized protein involved in this process is CPEB1. CPEB1 facilitates the transport of mRNAs with the cytoplasmic polyadenylation element (CPE) into dendrites (Huang et al., 2003), and it regulates their local translation in response to N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) activation (Huang et al., 2002). For this reason, CPEB1 also influences synaptic plasticity (Alarcon et al., 2004; Berger-Sweeney et al., 2006; McEvoy et al., 2007) and dendrite morphogenesis (Bestman and Cline, 2008).

In a previous work, we demonstrated that the *Down syndrome cell adhesion molecule* (*Dscam*) mRNA can be found in dendrites and it can be regulated by CPEB1 in the mouse hippocampus (Alves-Sampaio et al., 2010). *Dscam* is encoded by a gene located on human chromosome 21 (HSA21), making it potentially relevant to DS, the most frequent genetic cause of intellectual disability.

In the Ts1Cje DS mouse model (Sago et al., 1998), we also showed that there is 1.5-fold more *Dscam* mRNA in total hippocampal extracts from trisomic animals than in those of their control littermates. An even higher 2.6-fold increase was detected in synaptoneurosomes (Alves-Sampaio et al., 2010), a subcellular fraction enriched in pre- and post-synaptic elements that also contains dendritic mRNAs (Bagni et al., 2000). These results suggested that the enhanced dendritic accumulation of *Dscam* was not produced by simple over-expression due to its trisomy but rather, additional mechanisms were implicated that might involve *Dscam* mRNA transport proteins. Thus, we hypothesize that proteins that regulate transport of dendritic mRNAs could be affected in Ts1Cje hippocampus, and, consequently the dendritic levels of other local translated mRNAs, besides *Dscam*, could be increased.

Here we show that the *Dscam*-regulatory protein CPEB1 is overexpressed in the Ts1Cje hippocampus, as well as in neurons obtained from a DS human IPS cell line. Interestingly, the levels of two CPE-containing mRNAs, *MAP1B* and  *$\alpha$ -CaMKII*, were augmented in hippocampal synaptoneurosomes from this DS mouse model. Given the importance of mRNA transport to dendrites and local translation for synaptic plasticity, these data could be relevant for the synaptic phenotypes associated with DS.



## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

All the experiments performed here were carried out in accordance with the European Union directive for the use of laboratory animals and they were approved by the local Ethical Committee at the University of Seville. Partially trisomic Ts1Cje mice were originally obtained from Jackson Laboratories and they were maintained on a mixed genetic background as recommended, backcrossing Ts1Cje males to B6C3F1 hybrid females, supplied by Harlan or by Charles River.

### **Antibodies**

The following primary antibodies were used in this study: polyclonal CPEB1 (Abcam Cat# ab73287), monoclonal Microtubule-associated protein 2 (MAP2) (Millipore Cat# MAB378). The following secondary antibodies were also used: horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (Promega Cat# W4011), Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific Cat# A-21429), Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (Thermo Fisher Scientific Cat# A-11001).

### **Western blotting**

Total hippocampal protein extracts were prepared from adult (4-6 month-old) male animals sacrificed by cervical dislocation. The hippocampi of each mouse were quickly dissected out of the brain in ice-cold Hanks' balanced salt solution (HBSS) and immediately snap-frozen on dry ice. Using a mechanical overhead stirrer (Heidolph model RZR 2020) with a 2-ml Potter-Elvehjem (PTFE pestle), the tissue was homogenized in the following extraction buffer: 50 mM Tris buffer [pH 7.4], 0.5% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 3% SDS, protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma; 1:100 dilution), phosphatase inhibitor cocktail 2 (P5726, Sigma; 1:100 dilution), and phosphatase inhibitor cocktail 3 (P0044, Sigma; 1:100 dilution). The homogenized samples were then centrifuged at 14,500 rpm for 15 min at room temperature, and the supernatants were collected and aliquoted for storage at -80 °C.

Protein extracts were resolved by SDS-PAGE on Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ precast gels (BioRad) and then UV irradiated in a ChemiDoc XRS apparatus (BioRad) to induce the reaction of trihalo compounds present in the gel with the tryptophan residues of the

proteins. The resulting fluorescent signal was detected and used as a protein loading normalizer. Contrary to the chemiluminescent signal obtained by immunodetection of tubulin or beta-actin (which are highly expressed proteins), this fluorescent signal remains linear for a wide range of loaded protein (not shown). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes using commercial precut blotting transfer packs (BioRad). The binding of HRP-conjugated secondary antibodies was revealed with the WesternBright Quantum HRP Substrate (Advansta) and the chemiluminescence produced was measured on a ChemiDoc XRS (BioRad) imager.

### **Immunocytochemistry**

Hippocampal cultures from postnatal day 0 (P0) WT or trisomic mouse littermates were established as described previously (Alves-Sampaio et al., 2010). After 12-14 days *in vitro* (DIV), cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS) and subjected to dual immunocytochemistry (Alves-Sampaio et al., 2010) using antibodies against CPEB1 and MAP2 (to specifically mark the dendrites). The ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen) was used to preserve the immunofluorescence of the secondary antibodies. Images (12 bits; 512 x 512 pixels) were acquired on an Olympus Fluoview FV1000 confocal microscope using a PLAPON 60X objective (numerical aperture 1.42). Acquisition settings were adjusted for each particular experiment to maximize the dynamic range of pixel intensity for dendritic labeling of the protein of interest (CPEB1), avoiding saturation of the signal. Saturation was monitored with the confocal software (Fluoview, Olympus). A set of coverslips was exclusively dedicated to confocal setting adjustments in each experiment and they were not used for quantification to avoid errors due to photobleaching effects. The number (n) of confocal images taken and analyzed per condition for each experiment is indicated in the text; each image typically contained one neuron. Matlab software (Mathworks) was used to determine the mean pixel intensity (in arbitrary units, a.u.) for the corresponding immunofluorescent CPEB1 signal in dendrites (identified with MAP2 as a marker). The Matlab routine used was that described previously (Troca-Marín et al., 2011).

Control (ATCC-DYS0100) and DS (ATCC-DYP0730) human IPS cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC-LGC Standards). Cell culture before neural induction was performed following the ATCC instructions. Briefly, cells were thawed in a

37°C water bath, and washed with 5 ml of Pluripotent Stem Cell SFM XF/FF (ATCC) culture medium in a 15 ml conical tube. After centrifugation at 200 x g for 5 min, the supernatant was discarded. The cell pellet was resuspended with 1 ml of Pluripotent Stem Cell SFM XF/FF culture medium with ROCK inhibitor Y27632 (ATCC), and seeded onto four 6-cm dishes (Eppendorf) previously coated with CellMatrix Gel (CellMatrix Basement Membrane Gel, from ATCC) diluted in DMEM:F12 (ATCC).

Cell subculturing was carried out every 4-5 days using Stem Cell Dissociation Reagent (ATCC). To do that, the medium was aspirated, cells were rinsed twice with 4 ml of Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS from ATCC), and 2 ml of Stem Cell Dissociation Reagent were added to the dish. After incubation at 37°C for 2-5 min, the reagent was aspirated, and cells rinsed with 4 ml of DMEM:F12. Cells were detached from the dish by pipetting up and down in 2 ml of Pluripotent Stem Cell SFM XF/FF culture medium with ROCK inhibitor Y27632. Cell aggregates were transferred to a 15 ml conical tube, with an additional 3 ml of the same medium. After centrifugation at 200 x g for 5 min, the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended with 1 ml of Pluripotent Stem Cell SFM XF/FF culture medium with ROCK inhibitor Y27632. Cells were plated on 6-cm dishes coated with CellMatrix Gel diluted in DMEM:F12 in a 1:4 split ratio. Spontaneously differentiated colonies were removed using a P200 pipette.

Induction to neural stem cells (NSCs) and differentiation to neurons was performed as previously reported (Shi et al., 2012). Briefly, cells were detached from 6-cm dishes using Stem Cell Dissociation Reagent, and plated on 12-well plates (Nunc) coated with CellMatrix Gel. Previously, the colonies were broken into fragments containing 50-100 cells using a P1000 pipette. For each well, the material from three 6-cm dishes was used. Cells were cultured in 800 µl of Pluripotent Stem Cell SFM XF/FF medium containing 10 ng of Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2, PeproTech) per ml. Cell density was adjusted in order to have 100% confluence one day after plating. If it was the case, neural induction was initiated by washing the cells once with PBS, and adding 1 ml of Neural Induction medium per well. Neural Induction medium is Neural Maintenance medium supplemented with 500 ng/mL Noggin (R&D Systems) and 10 µM SB431542 (Tocris Bioscience). Medium was replaced every day, and cells were monitored for morphological changes during differentiation. 10 days after the induction, a uniform neuroepithelial sheet was formed, and it was collected using Stem Cell Dissociation Reagent for 3 h at 37°C. The neuroepithelial sheet was broken into aggregates (300-500 cells) by pipetting up and down three times with a P1000 pipette.

Aggregates were centrifuged at 160 x g for 2 min and washed two times with 10 ml of Neural Maintenance medium. Neural Maintenance medium is a 1:1 mixture of N-2 and B-27 media; N-2 medium contain: DMEM/F12 GLUTAMAX (Gibco), 1x N-2 supplement (Gibco), 5 µg insulin (Sigma-Aldrich) per ml, 1mM L-Glutamine (Gibco), 100 µM of non essential amino acids (Gibco), 100 mM of 2-mercaptoethanol (Gibco), 50 U /ml of penicillin and 50 µg of streptomycin per ml); B-27 medium contains: Neurobasal, 1x B-27, 1mM L-Glutamine, 50 U /ml of penicillin and 50 µg of streptomycin (Gibco) per ml.

Cells were then resuspended in 200 µl of Neural Induction medium and plated onto a 35-mm dish (coated with laminin (Sigma-Aldrich)), containing 2 ml of Neural Induction medium. The medium was changed to Neural Maintenance medium the day after. Neural rosette structures appeared around day 15 after neural induction, and at this point FGF2 (20 ng per ml) was added for 2 days. Then, cells were expanded further by passaging with Stem Cell Dissociation Reagent. Cells were washed twice with Neural Maintenance medium, and plated onto two laminin-coated 35-mm dishes containing Neural Maintenance medium. When neurons first begin to accumulate at the outside of the rosettes (day 34 after neural induction in our case), cells were passaged with 0.5 ml Accutase (Biowest) per dish. Cells were incubated at 37°C for 5 min, and pipetted up and down 3 times in the Accutase solution. Cells were washed with 4 volumes of Neural Maintenance medium and plated onto coverslips coated with laminin and Poly-L-ornithine solution (Sigma-Aldrich) in 12-well plates at 50,000 cells per cm<sup>2</sup>. The Neural Maintenance medium was changed every other day, and cells were fixed 10-15 days after (day 44-49 after neural induction). We observed that all MAP2-positive cells expressed CPEB1 and VGLUT1, and conclude that, as expected (Shi et al., 2012), they were glutamatergic neurons (not shown).

Immunocytochemistry and image analysis were performed as indicated above, but in this case, 16 bits, 640 x 640 pixels images were used.

### **Immunohistochemistry**

To obtain both coronal and sagittal brain sections, four animals, two adult (4-month-old) male WT mice and two male Ts1Cje littermates, were used in each case. The mice were perfused with 4% PFA, and their brains were removed and post-fixed by immersion in 4% PFA at 4°C overnight. The brains were then transferred to a 30% sucrose solution in PBS for one or two days at 4°C for cryoprotection. Both coronal and sagittal 50 µm sections were made in a Leica

CM1950 cryostat. For CPEB1 and MAP2 dual immunostaining, the brain sections were treated with 1% Triton X-100 in PBS at room temperature (RT) for 10 min, washed in PBS, and blocked for 1h at RT in a solution containing 0.1% Triton X-100 and 2% bovine serum albumin in PBS. Antibodies against CPEB1 and MAP2 were diluted in the blocking solution and applied. Slices were mounted on microscope glass slides with Prolong. Brain images were acquired on a Zeiss Apotome.2 structured illumination microscope (Microscopy Service of the University of Seville - CITIUS).

### **Synaptoneurosome preparation, RNA isolation and real-time quantitative RT-PCR**

Synaptoneurosome preparation was performed from 2-6 month-old adult mice as described previously (Bagni et al., 2000) and with the modifications introduced by Alves-Sampaio et al. (2010). RNA from synaptoneurosome was isolated using the PureLink Micro to Midi total RNA purification system (Invitrogen). On-column DNase (Sigma-Aldrich) treatment was applied during the isolation procedure.

Real-time quantitative RT-PCR analysis was carried out as described previously (Alves-Sampaio et al., 2010). In brief, the RNA isolated was reverse transcribed with random hexamer primers and the cDNAs obtained were used as the templates for real-time PCR (3 replicates per gene), carried out on an Mx3000P apparatus (Stratagene) using a commercial SYBR Green master mix. Negative controls for reverse transcription were included routinely. After amplification, the melting curves were analyzed to confirm the identity of the PCR products. The primer sequences for gene amplification were:

$\alpha$ -CamKII-fw

5'-GGAGGAAACAAGAAGAACGATG

$\alpha$ -CamKII-rv

5'-TCAGCTGCTCTGTCACCTTTGAT

MAP1B-fw

5'-CAACATGCAGGTGACTCTGATT

MAP1B-rv

5'-ACCACTGTACTGCTGCTTGCTA

SnrpN-fw

5'-GGGAGAACTTGGTTTCAATGAC

SnrpN-rv

5'-AATAGGTACACCTGCTGGCACT

HPRT-fw

5'-GGACCTCTCGAAGTGTTGGATA

HPRT-rv

5'-ACGTGATTCAAATCCCTGAAGT

The efficiency of the primers was calculated from standard curves using serial dilutions of the cDNA. For *MAP1B* the efficiency was 86.7%. The efficiencies for  $\alpha$ -*CaMKII* (90.4%), *SnrpN* (Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N) (89.9%) and *HPRT* (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) (85.5%) were established in a previous work (Alves-Sampaio et al., 2010). These figures were taken into account in the calculations performed using qBase software (Hellemans et al., 2007). Since synaptoneurosome preparation protocols do not result in biochemically purified fractions, but in subcellular fractions enriched in synaptoneurosome with some degree of somatic contamination, *HPRT* and *SnrpN*, which are soma-restricted mRNAs (Buettner et al., 2000; Di Nardo et al., 2007) were used as normalizer and negative control, respectively.

### **Statistical analysis**

The quantitative data are presented as the mean  $\pm$  SEM. The significance of the comparisons was calculated using the Student's test (SigmaStat software). All *p* values are indicated.

## **RESULTS**

### **The level of the local translation regulatory protein CPEB1 is enhanced in the Ts1Cje hippocampus**

We showed previously that there was an abnormal increase in *Dscam* transcripts in hippocampal Ts1Cje synaptoneurosome, these subcellular fractions containing dendritic mRNAs (Alves-Sampaio et al., 2010). The anomalous accumulation of dendritic mRNAs could ensue from enhanced transport and/or stability of these transcripts. Since CPEB1 is a key regulator of the transport and local translation of many dendritic transcripts, and binds to *Dscam* mRNA (Alves-Sampaio et al., 2010), we analysed the expression of CPEB1 in Ts1Cje

and WT mice. In order to quantify the levels of this protein, hippocampal extracts from adult animals were analysed by Western blot. A modest, yet significant increase of CPEB1 ( $p = 0.034$ ,  $t$  test,  $n = 4$ ) was evident in quantitative Western blots of the Ts1Cje mice (Fig. 1).

To evaluate the amount of CPEB1 specifically located in the dendritic compartment, we performed fluorescence immunocytochemistry in primary cultures of hippocampal neurons, and the fluorescence level of CPEB1 in MAP2-positive neurites was measured. CPEB1 labeling was 1.6-fold higher in Ts1Cje neurons than in those from the WT ( $n=10$ ,  $p<0.001$ , DIV14 neurons) (Fig. 2). Three additional independent experiments were carried out, showing similar results (1.4-fold,  $n=10$ ,  $p=0.060$ , DIV12 neurons; 1.6-fold,  $n=8$ ,  $p=0.01$ , DIV12 neurons; 1.8-fold,  $n=10$ ,  $p<0.001$ , DIV14 neurons; not shown).

These results were further corroborated by using immunohistochemistry techniques. Thus, as observed in Fig. 3, CPEB1 was mainly and consistently overexpressed in the hippocampus of Ts1Cje mice. Other brain regions showing increased CPEB1 signal were the caudate putamen (in the striatum dorsal region), the central and medial amygdalar nuclei (in the striatum caudal region), and the piriform area (Fig. 3A). Surprisingly, a lower CPEB1 expression was found for the cerebellar vermis lobules VIII, IX and X of Ts1Cje mice (Fig. 3B).

Together these results revealed that there were higher levels of CPEB1 in the Ts1Cje hippocampus, which might collaborate to the increase of *Dscam* mRNA in dendrites observed in this brain structure (Alves-Sampaio et al., 2010).

### **The level of CPEB1 is enhanced in dendrites of neurons derived from DS human iPSCs**

Although the Ts1Cje mice and other DS murine models have demonstrated to be extremely useful to investigate the neuronal phenotypes associated to DS, these models are partially trisomic, and do not contain all the HSA21 orthologous genes in triplicated. In order to know if CPEB1 protein levels were also increased in the human complete-trisomy 21 condition, we performed neural induction of a control (ATCC-DYS0100) and a DS (ATCC-DYP0730) human iPSC line, followed by differentiation to cortical neurons, as previously described (Shi et al., 2012). Neurons differentiated for fifteen days after neural induction were fixed, and CPEB1/MAP2 fluorescence immunocytochemistry was carried out. CPEB1

dendritic labeling was measured in MAP2-positive neurites. As shown in Fig. 4, increased levels of CPEB1 were measured in the dendrites of DS neurons, compared to control (1.3-fold, n=10, p=0.018).

### **The levels of *α-CaMKII* and *MAP1B* mRNAs are augmented in hippocampal Ts1Cje synaptoneuroosomes**

It has been previously shown that the overexpression of CPEB enhances the transport of CPE-containing RNAs (Huang et al., 2003). Thus, abnormal levels of CPEB1 protein in Ts1Cje neurons should have an impact on the accumulation of target mRNAs in dendrites. By quantitative RT-PCR, we evaluated whether there was an abnormal increase of *α-CaMKII* and *MAP1B* mRNAs, two CPEB targets, in Ts1Cje synaptoneuroosomes.

A statistically significant increase in the levels of both transcripts was measured in Ts1Cje synaptoneuroosomes, compared to WT (Fig. 5), suggesting that dendritic mRNA transport of these dendritic transcripts was altered in trisomic mice.

## **DISCUSSION**

Local dendritic translation is a pivotal process for long-term synaptic plasticity and consequently, for learning and memory. CPEB1 is an important regulator of dendritic mRNA transport and translation (Ivshina et al., 2014). In this study, we show that there is an increase in CPEB1 protein in the hippocampus of a DS mouse model. Moreover, a similar increase was measured in cortical neurons derived from a DS human IPS cell line, suggesting that CPEB1 overexpression could be relevant for the intellectual disability associated with DS.

Accordingly, we found that, besides *Dscam* (Alves-Sampaio et al., 2010), two other dendritic mRNAs, *MAP1B* (Brown et al., 2001; Darnell et al., 2001; Lu et al., 2004; Dichtenberg et al., 2008) and *α-CaMKII* (Wu et al., 1998; Dichtenberg et al., 2008; Kao et al., 2010), were present in larger amounts in Ts1Cje synaptoneuroosomes. Hence, although the cause remains to be elucidated, the enhanced accumulation of dendritic mRNAs in Ts1Cje synaptic preparations is probably unrelated to direct trisomy-linked overexpression (since *MAP1B* and *α-CaMKII* are disomic genes in Ts1Cje mice), and it might be connected to the



higher levels of CPEB1. Interestingly, over-expression of CPEB enhances the transport of CPE-containing mRNAs to dendrites, whereas neurons derived from CPEB-knockout mice show reduced dendritic transport of CPE-containing RNAs. (Huang et al., 2003).

Considering the prominent role of CPEB1 in synaptic plasticity, learning and memory, the results described here are likely to be relevant when considering the intellectual disability associated with DS, and suggests that dendritic mRNA transport and translation could be broadly affected in trisomy 21.

**ACKNOWLEDGEMENTS AND CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURE:** This work was funded by the Junta de Andalucía (Spain: Grants P09-CTS-4610 and P12-CTS-1818), the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (Spain, Grant: SAF2015-65032-R), the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and the Fondation Jérôme Lejeune (France). The authors have no conflicts of interests to declare regarding the contents of this article.

## REFERENCES

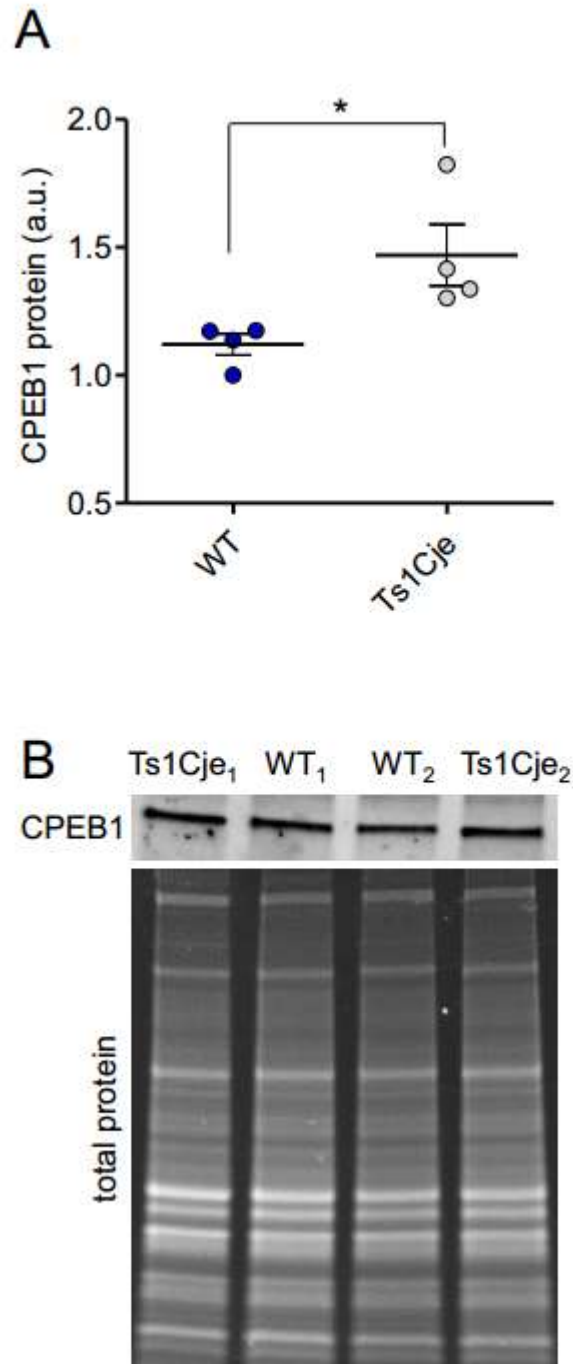
- Alarcon, J. M., Hodgman, R., Theis, M., Huang, Y. S., Kandel, E. R. and Richter, J. D. (2004) Selective modulation of some forms of schaffer collateral-CA1 synaptic plasticity in mice with a disruption of the CPEB-1 gene. *Learn Mem*, **11**, 318-327.
- Alves-Sampaio, A., Troca-Marín, J. A. and Montesinos, M. L. (2010) NMDA-mediated regulation of DSCAM dendritic local translation is lost in a mouse model of Down's syndrome. *J Neurosci*, **30**, 13537-13548.
- Bagni, C., Mannucci, L., Dotti, C. G. and Amaldi, F. (2000) Chemical stimulation of synaptosomes modulates alpha -Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II mRNA association to polysomes. *J Neurosci*, **20**, RC76.
- Berger-Sweeney, J., Zearfoss, N. R. and Richter, J. D. (2006) Reduced extinction of hippocampal-dependent memories in CPEB knockout mice. *Learn Mem*, **13**, 4-7.
- Bestman, J. E. and Cline, H. T. (2008) The RNA binding protein CPEB regulates dendrite morphogenesis and neuronal circuit assembly in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 20494-20499.

- Brown, V., Jin, P., Ceman, S. et al. (2001) Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell*, **107**, 477-487.
- Buettner, V. L., LeBon, J. M., Gao, C., Riggs, A. D. and Singer-Sam, J. (2000) Use of terminal transferase-dependent antisense RNA amplification to determine the transcription start site of the *Snrpn* gene in individual neurons. *Nucleic Acids Res*, **28**, E25.
- Darnell, J. C., Jensen, K. B., Jin, P., Brown, V., Warren, S. T. and Darnell, R. B. (2001) Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell*, **107**, 489-499.
- Di Nardo, A. A., Nedelec, S., Trembleau, A., Volovitch, M., Prochiantz, A. and Montesinos, M. L. (2007) Dendritic localization and activity-dependent translation of *Engrailed1* transcription factor. *Mol Cell Neurosci*, **35**, 230-236.
- Dictenberg, J. B., Swanger, S. A., Antar, L. N., Singer, R. H. and Bassell, G. J. (2008) A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Dev Cell*, **14**, 926-939.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. and Vandesompele, J. (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*, **8**, R19.
- Huang, Y. S., Carson, J. H., Barbarese, E. and Richter, J. D. (2003) Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB. *Genes Dev*, **17**, 638-653.
- Huang, Y. S., Jung, M. Y., Sarkissian, M. and Richter, J. D. (2002) N-methyl-D-aspartate receptor signaling results in Aurora kinase-catalyzed CPEB phosphorylation and alpha CaMKII mRNA polyadenylation at synapses. *Embo J*, **21**, 2139-2148.
- Hutten, S., Sharangdhar, T. and Kiebler, M. (2014) Unmasking the messenger. *RNA Biol*, **11**, 992-997.
- Ivshina, M., Lasko, P. and Richter, J. D. (2014) Cytoplasmic polyadenylation element binding proteins in development, health, and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **30**, 393-415.
- Kao, D. I., Aldridge, G. M., Weiler, I. J. and Greenough, W. T. (2010) Altered mRNA transport, docking, and protein translation in neurons lacking fragile X mental retardation protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 15601-15606.
- Lu, R., Wang, H., Liang, Z., Ku, L., O'Donnell W, T., Li, W., Warren, S. T. and Feng, Y. (2004) The fragile X protein controls microtubule-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development. *Proc Natl Acad Sci U S A*,

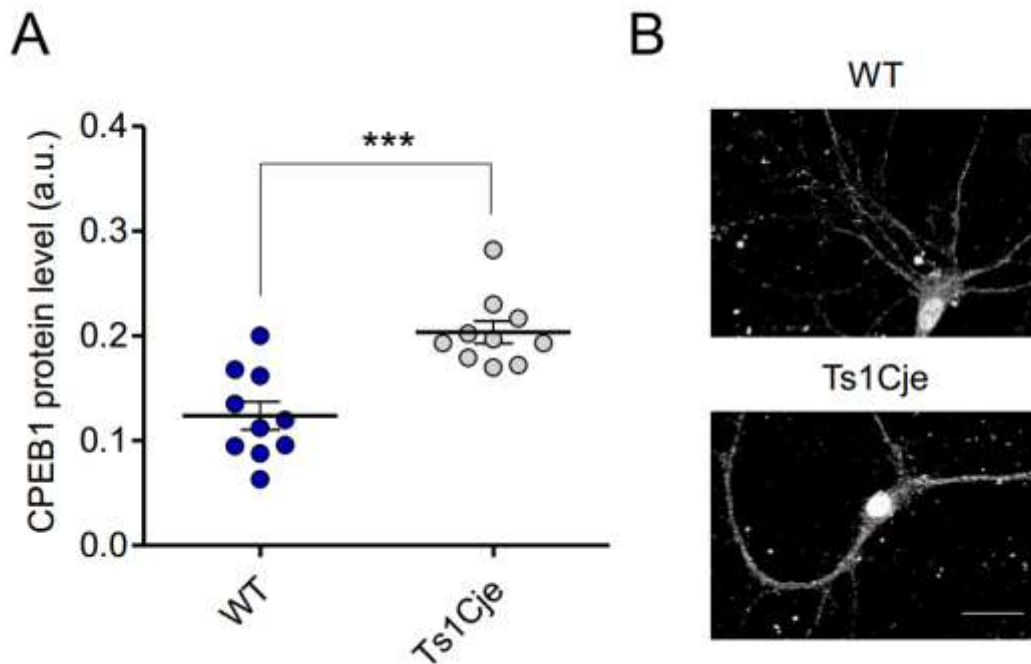
**101**, 15201-15206.

- McEvoy, M., Cao, G., Montero Llopis, P., Kundel, M., Jones, K., Hofler, C., Shin, C. and Wells, D. G. (2007) Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1-mediated mRNA translation in Purkinje neurons is required for cerebellar long-term depression and motor coordination. *J Neurosci*, **27**, 6400-6411.
- Sago, H., Carlson, E. J., Smith, D. J., Kilbridge, J., Rubin, E. M., Mobley, W. C., Epstein, C. J. and Huang, T. T. (1998) Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6256-6261.
- Troca-Marín, J. A., Alves-Sampaio, A. and Montesinos, M. L. (2011) An increase in basal BDNF provokes hyperactivation of the Akt-mammalian target of rapamycin pathway and deregulation of local dendritic translation in a mouse model of Down's syndrome. *J Neurosci*, **31**, 9445-9455.
- Wu, L., Wells, D., Tay, J. et al. (1998) CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses. *Neuron*, **21**, 1129-1139.

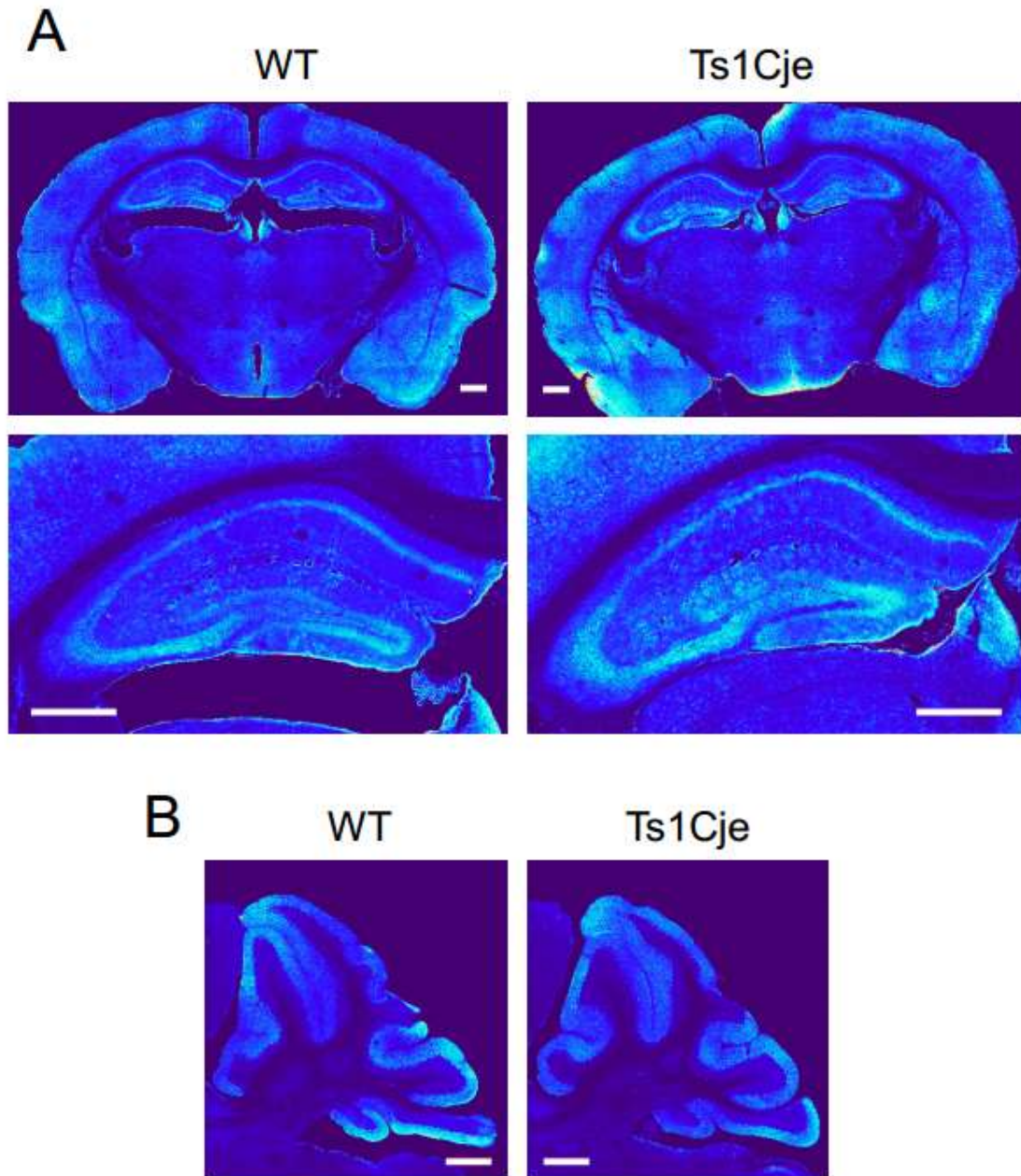
## **FIGURES**



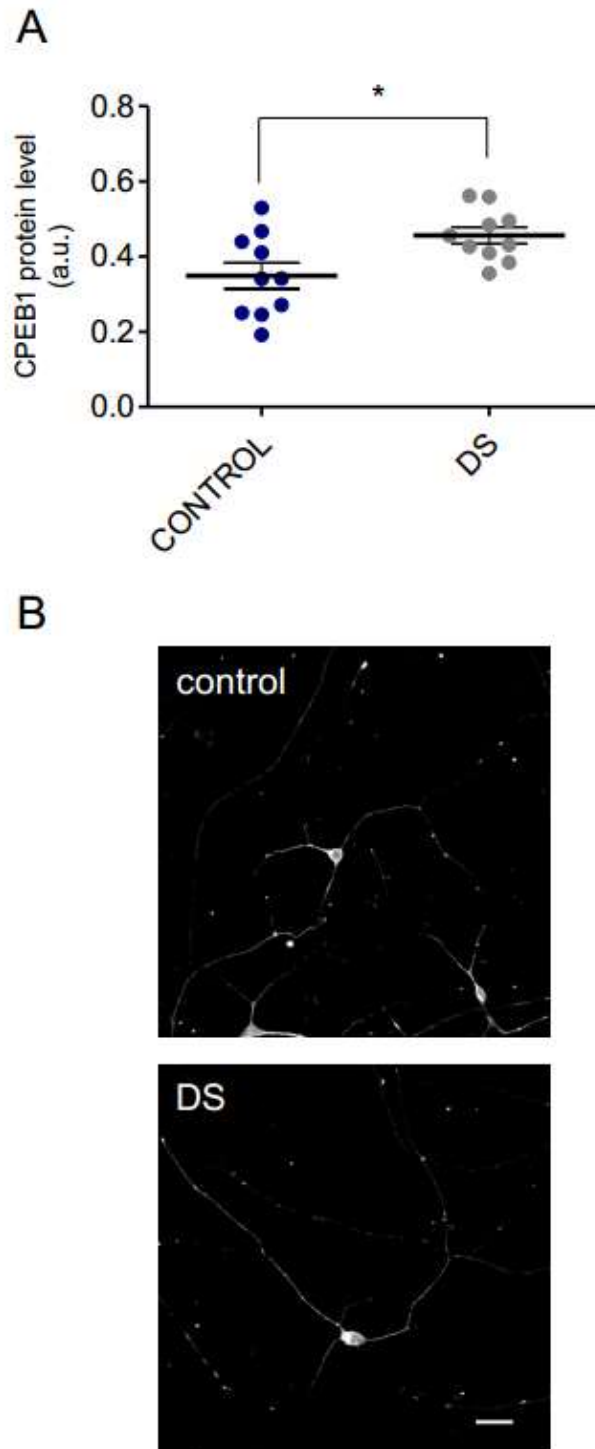
**Figure 1. Western blot quantification of the CPEB1 protein in the wild-type and Ts1Cje hippocampus.** (A) Hippocampal proteins from four pairs of wild-type (WT) and Ts1Cje adult mice were analyzed in Western blots probed with an anti-CPEB1 antibody. The signals were normalized to the total protein loaded and the mean and SEM values are shown ( $p = 0.034$ , denoting a significant difference). a.u., arbitrary units. (B) Representative Western blot showing two of the WT and Ts1Cje pairs analyzed.



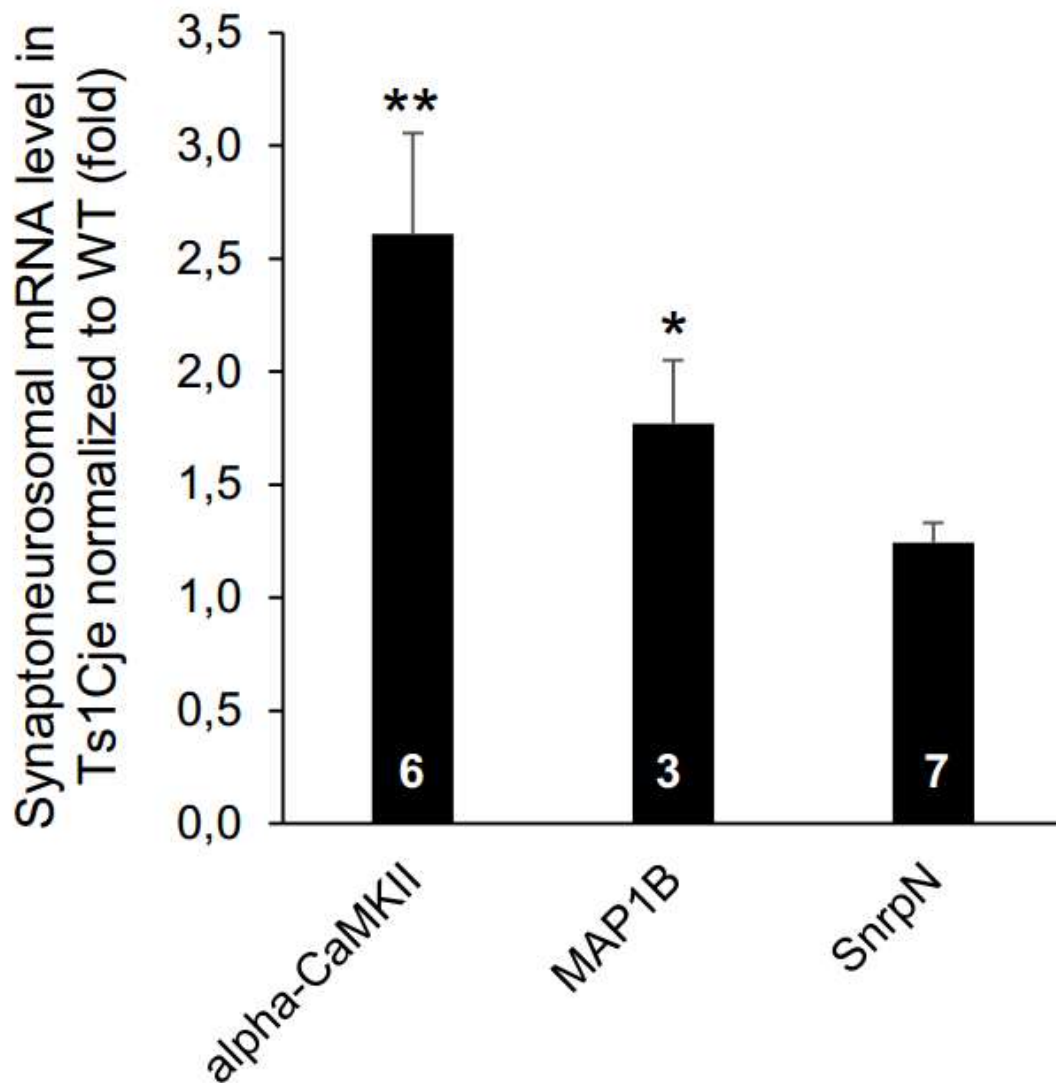
**Figure 2. Dendritic CPEB1 protein in hippocampal neurons from wild-type and Ts1Cje mice.** (A) Quantification of the relative CPEB1 protein in the dendrites of wild-type (WT) and Ts1Cje hippocampal neurons at DIV14. The mean pixel intensity for CPEB1 immunofluorescence in dendrites is shown in arbitrary units (a.u.). A 1.6-fold increase was detected in Ts1Cje neurons ( $n=10$ ,  $p<0.001$ ) in this particular experiment. The error bars indicate the SEM and the asterisk denote a statistically significant difference. (B) Representative gray scale confocal images from the experiment in panel A, showing CPEB1 labeling in WT and Ts1Cje neurons. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .



**Figure 3. CPEB1 protein expression in brain slices from wild-type and Ts1Cje mice. (A)** Expression of CPEB1 protein in coronal sections of wild-type (WT) and Ts1Cje brains. Bottom panels show a magnification of the corresponding hippocampal region. Scale bar = 500  $\mu$ m. **(B)** Expression of CPEB1 protein in the cerebellum of WT and Ts1Cje mice (sagittal sections). Scale bar = 500  $\mu$ m. For a better comparison, images were processed using the thermal lookup table of Image J.



**Figure 4. Dendritic CPEB1 protein in neurons derived from control and DS human IPSCs.** (A) Quantification of the relative CPEB1 protein in the dendrites of control and DS neurons. The mean pixel intensity for CPEB1 immunofluorescence in dendrites is shown in arbitrary units (a.u.). A 1.3-fold increase was detected in DS neurons ( $n=10$ ,  $p<0.018$ ). The error bars indicate the SEM and the asterisk denote a statistically significant difference. (B) Representative gray scale confocal images from the experiment in panel A, showing CPEB1 labeling in control and DS neurons. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .



**Figure 5. Quantification of CPEB1 target mRNAs in wild-type and Ts1Cje hippocampal synaptoneurosomal fractions.** *α-CaMKII*, *MAP1B* and *SnrpN* mRNAs were quantified by real-time RT-PCR in synaptoneurosomal fractions from the wild-type (WT) and Ts1Cje hippocampus, and normalized to the *Hprt* mRNA in the corresponding sample. The number of independent synaptoneurosomal preparations analyzed in each case is indicated in the bars. The mRNA level in Ts1Cje synaptoneurosomal fractions compared to WT is shown in each case as the mean. The error bars indicate the SEM and the asterisks denote statistically significant differences with respect to synaptoneurosomal *SnrpN* (somatic mRNA control) values: \* $p < 0.05$  or \*\* $p < 0.01$ .