



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA MÉDICA Y BIOFÍSICA

**ESTUDIO DE COMPORTAMIENTO EN PRUEBAS DE MEMORIA Y APRENDIZAJE DEL
RATÓN MODELO DE SÍNDROME DE DOWN Ts1Cje, Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LA
DESREGULACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN Akt-mTOR**

Itziar Benito Latasa de Aranibar

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla

Sevilla, 2017

Lista de abreviaturas	Pág. iii
Lista de figuras	Pág. v
Lista de tablas	Pág. vii
1. INTRODUCCIÓN	Pág. 1
1.1. Origen del síndrome de Down. Cromosoma 21	Pág. 2
1.2. Características fenotípicas del síndrome de Down	Pág. 3
1.2.1. Alteraciones morfológicas cerebrales	Pág. 5
1.2.2. Alteraciones en la neurogénesis	Pág. 6
1.2.3. Alteraciones morfológicas neuronales. Alteraciones en espinas dendríticas	Pág. 7
1.2.4. Déficits cognitivos: memoria y aprendizaje	Pág. 9
1.3. El hipocampo	Pág. 11
1.4. Modelos murinos de síndrome de Down. El ratón Ts1Cje como modelo de estudio	Pág. 14
1.4.1. Alteraciones en el cerebro	Pág. 17
1.4.2. Alteraciones en la neurogénesis	Pág. 17
1.4.3. Alteraciones en la morfología dendrítica	Pág. 18
1.4.4. Alteraciones en la plasticidad sináptica	Pág. 18
1.4.5. Déficits de memoria y aprendizaje	Pág. 19
1.5. Implicaciones de la traducción local en plasticidad sináptica, memoria y aprendizaje	Pág. 22
1.6. Regulación de la traducción local por mTOR y ERK	Pág. 24
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	Pág. 28
3. MATERIALES Y MÉTODOS	Pág. 30
3.1. Mantenimiento y genotipado de la colonia	Pág. 31
3.2. Pruebas sensoriales y motoras	Pág. 32
3.3. Pruebas de memoria	Pág. 34
3.4. Tratamiento de los ratones con rapamicina	Pág. 37
3.5. Aislamiento de sinaptoneurosomas de hipocampo	Pág. 38
3.6. Marcaje y análisis mediante iTRAQ	Pág. 38
3.7. Análisis de ontología de genes y de vías de señalización	Pág. 39

3.8. Western blot cuantitativo	Pág. 41
3.9. Análisis estadístico	Pág. 41
4. RESULTADOS	Pág. 43
4.1. El comportamiento de exploración en el test de “ <i>object recognition</i> ” está afectado en los ratones Ts1Cje, y la rapamicina recupera dicho fenotipo	Pág. 44
4.2. La persistencia de la memoria espacial a largo plazo está afectada en los ratones Ts1Cje, y este déficit es revertido por la rapamicina	Pág. 45
4.3. Caracterización proteómica de sinaptoneurosomas de hipocampo de ratones WT y Ts1Cje, tratados o no con rapamicina	Pág. 52
5. DISCUSIÓN	Pág. 61
5.1 Efecto terapéutico de la rapamicina sobre el comportamiento exploratorio y la persistencia de la LTM en los ratones Ts1Cje	Pág. 62
5.2 Modificación del proteoma sináptico hipocampal por rapamicina en los ratones Ts1Cje	Pág. 65
6. CONCLUSIONES	Pág. 71
7. BIBLIOGRAFÍA	Pág. 74
8. ANEXOS	Pág. 86
- The Akt-mTOR pathway in Down's syndrome: the potential use of rapamycin/rapalogs for treating cognitive deficits	
- Rapamycin restores BDNF-LTP and the persistence of long-term memory in a model of Down's syndrome	

Lista de abreviaturas

4E-BPs	<i>eIF4E-binding proteins</i>
AKT	<i>Protein Kinase B</i>
AMPA	γ -amino 3-hidroxi 5-metil 4-isoxazol propiónico
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
CA	Cuerno de Amón
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
CV	Coefficiente de variación
DSCR	Región Crítica del Síndrome Down
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FKBP1	<i>FK506-binding protein 1α, también conocida como FKBP12</i>
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GD	Giro dentado
HSA21	Cromosoma humano 21
IDs	Proteínas mapeadas
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
iTRAQ	<i>Isobaric tags for relative and absolute quantitation</i>
LTD	Depresión a largo plazo
LTM	Memoria a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i>
MMU16	Cromosoma 16 murino (Mus Musculus 16)
Mnk1	<i>Mitogen-activated protein kinase integrating kinase 1</i>
mTOR	<i>Akt-mammalian Target Of Rapamycin</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
NORT	<i>Novel Object Recognition Test</i>
p70S6K	<i>Ribosomal protein S6 Kinase</i>

PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
RSK	<i>p90 ribosomal S6 kinase</i>
SD	Síndrome de Down
SGZ	Zona subgranular del giro dentado
SNC	Sistema Nervioso Central
SNs	Sinaptoneurosomas
STM	Memoria a corto plazo
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

Lista de figuras

Figura 1. Cariotipo espectral de una persona (mujer) con síndrome de Down	Pág. 2
Figura 2. Representación de segmentos dendríticos de neuronas piramidales de la región CA1	Pág. 8
Figura 3. Clasificación integradora del aprendizaje y la memoria, y las principales áreas cerebrales implicadas en dichos procesos	Pág. 11
Figura 4. Principales conexiones en la formación hipocampal	Pág. 12
Figura 5. Circuito trisináptico del hipocampo	Pág. 14
Figura 6. Localización de genes del HSA21 en los cromosomas MMU16, 17 y 10.	Pág. 15
Figura 7. Test de “ <i>Morris Water Maze</i> ”	Pág. 20
Figura 8. Test del laberinto en forma de T	Pág. 22
Figura 9. Test “ <i>open-field</i> ”	Pág. 22
Figura 10. Familias funcionales de mRNAs identificados en el compartimento post-sináptico de neuronas de hipocampo	Pág. 23
Figura 11. Regulación de la traducción local por BDNF a través de mTOR y ERK	Pág. 25
Figura 12. Estructura química de la rapamicina y otros compuestos análogos	Pág. 26
Figura 13. Test de coordinación motora “ <i>vertical pole</i> ”	Pág. 33
Figura 14. Test de coordinación motora “ <i>hanging wire</i> ”	Pág. 34
Figura 15. Test “object recognition”	Pág. 35
Figura 16. Test “Barnes maze”	Pág. 36
Figura 17. Control de la eficacia del tratamiento intraperitoneal con rapamicina	Pág. 37
Figura 18. Aislamiento de sinaptoneurosomas	Pág. 39
Figura 19. Esquema temporal del protocolo seguido en el test “ <i>Barnes maze</i> ”	Pág. 46
Figura 20. Análisis del aprendizaje espacial de ratones WT y Ts1Cje no tratados, y ratones Ts1Cje tratados con vehículo (Ts1Cje vehicle) o rapamicina (Ts1Cje RAPA) evaluado por día de entrenamiento	Pág. 47

Figura 21. Análisis del aprendizaje espacial de ratones WT y Ts1Cje no tratados, y ratones Ts1Cje tratados con vehículo (Ts1Cje vehicle) o rapamicina (Ts1Cje RAPA) evaluado por prueba durante la fase de entrenamiento	Pág. 48
Figura 22. Análisis de la consolidación y la persistencia de la memoria espacial de ratones WT y Ts1Cje no tratados, y ratones Ts1Cje tratados con vehículo (Ts1Cje vehicle) o rapamicina (Ts1Cje RAPA).	Pág. 49
Figura 23. Diferencias en la ocupación del cuadrante <i>target</i> , latencia primaria y número de errores primarios en la prueba de memoria a 8 días <i>versus</i> 24 h para cada ratón individual	Pág. 51
Figura 24. Rutas canónicas identificadas mediante IPA entre los conjuntos de proteínas desreguladas en SNs de ratones WT RAPA (A) y Ts1Cje RAPA (B)	Pág. 56
Figura 25. Análisis Z score de las rutas canónicas identificadas mediante IPA entre los conjuntos de proteínas desreguladas en SNs de ratones WT RAPA (A) y Ts1Cje RAPA (B)	Pág. 57
Figura 26. Análisis de la vía mTOR mediante IPA en SNs de ratones WT RAPA (A) y Ts1Cje RAPA	Pág. 58
Figura 27. Detección mediante Western blot de los niveles de FKBP1 en SNs de hipocampo de ratones WT y Ts1Cje tratados o no con rapamicina.	Pág. 59
Figura 28. Análisis de las vías de disfunción mitocondrial y fosforilación oxidativa mediante IPA en SNs de ratones WT RAPA (A) y Ts1Cje RAPA (B)	Pág. 69
Figura 29. Predicción de la actividad de la vía mTOR en SNs de ratones WT RAPA (A) y Ts1Cje RAPA (B) mediante la función de IPA “ <i>Molecule Activity Predictor</i> ”	Pág. 70

Lista de tablas

Tabla 1. Alteraciones anatómicas cerebrales más características del SD Pág. 6

Tabla 2. Características fenotípicas comunes entre personas con SD y los ratones Ts1Cje y Ts65Dn Pág. 16

Tabla 3. *Test* de comportamientos llevados a cabo en el modelo Ts1Cje Pág. 20

Tabla 4. Resultados obtenidos en el *test "object recognition"* Pág. 45

Tabla 5. Efecto de la rapamicina en la memoria espacial de ratones WT Pág. 52

Tabla 6. Cambios proteómicos en SNs de hipocampo de ratones Ts1Cje, WT RAPA y Ts1Cje RAPA Pág. 54

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Origen del síndrome Down: cromosoma 21

El síndrome Down (SD) también conocido como trisomía 21, es la alteración genética más frecuente que cursa con discapacidad intelectual (1 de cada 800 nacimientos). Se debe a la presencia de una copia extra del cromosoma 21 (HSA21), dando lugar a un cariotipo con 47 cromosomas en lugar de 46 (Fig. 1).

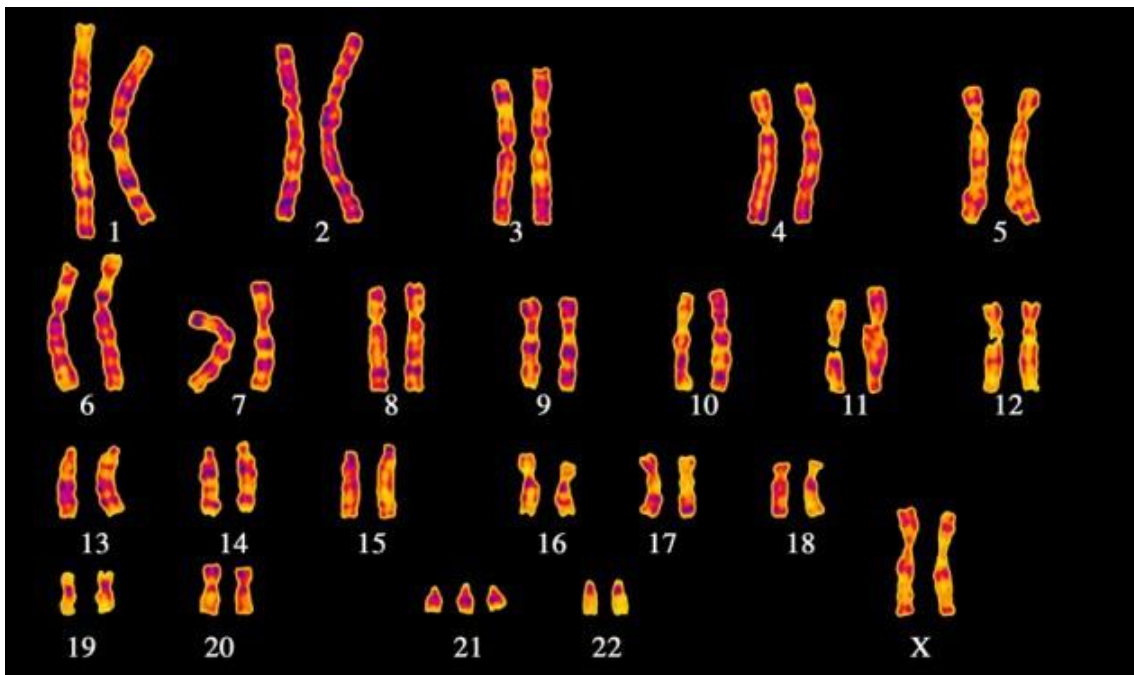


Figura 1. Cariotipo espectral de una persona (mujer) con síndrome de Down. Tomado de <http://scienceblogs.com/pharyngula/files/2014/03/tri21.jpg>.

Debe su nombre al médico británico John Langdon Haydon Down, que en 1866 publicó los rasgos comunes observados a una grupo concreto de personas con esta patología, sin llegar a determinar la causa. Su origen genético no se estableció hasta 1958, cuando Jérôme Lejeune, genetista francés, descubrió que este síndrome se debía a una alteración cromosómica del par 21, que se traduce en una sobreexpresión de las proteínas codificadas por los genes localizados en dicho cromosoma.

Existen tres tipos de alteraciones cromosómicas que dan lugar al SD, siendo la más frecuente (95% de los casos) la trisomía completa o parcial del HSA21, producida por la

no-disyunción meiótica de este cromosoma en la línea germinal de uno de los progenitores, normalmente de la madre. En tan solo el 1,5% de los casos esta no-disyunción ocurre en las primeras divisiones embrionarias, dando lugar a mosaicismo. Por último, alrededor del 5% de los casos de SD presenta trisomía parcial debido a translocaciones que pueden ser robertsonianas o recíprocas.

El HSA21 tiene aproximadamente 48 Mb, lo que lo convierte en el cromosoma humano más pequeño, conteniendo el 1,5% del genoma humano. El brazo largo de este cromosoma fue secuenciado completamente hace más de una década (Hattori et al., 2001), y los estudios más recientes muestran que contiene 696 genes, incluyendo 235 genes codificadores de proteínas y 142 pseudogenes (Sturgeon y Gardiner 2011).

A partir de estudios de correlación genotipo-fenotipo se ha acotado una región cromosómica de 5.4 Mb en el HSA21, que se extiende desde el marcador D21S17 hasta el gen Mx1, y se considera como la región mínima que debe estar triplicada para que se manifieste el fenotipo propio del SD en cuanto a discapacidad intelectual. Esta región se denomina “Región Crítica del Síndrome Down” (DSCR).

En la actualidad se entiende esta región como una región de susceptibilidad que puede verse modificada por otros genes del HSA21 y otros cromosomas del individuo (Lyle et al., 2009). Por lo tanto los genes incluidos en esta región, aproximadamente 30, son considerados buenos candidatos a tener un importante papel en los fenotipos comunes encontrados en el SD.

1.2. Características fenotípicas del SD

La intensidad y frecuencia con la que se manifiestan los distintos fenotipos en el SD es muy amplia, y difiere notablemente de un sujeto a otro debido a la compleja interacción que se da entre factores genéticos y medioambientales (Dierssen, 2012). Se han descrito hasta 300 rasgos fenotípicos diferentes asociados a esta cromosopatía. Dentro de estos rasgos, los hay comunes a todos los individuos con SD, como son el deterioro cognitivo, las alteraciones motoras, la hipotonía muscular, así como ciertos

rasgos faciales y corporales, mientras que otros como las cardiopatías, anomalías en el aparato digestivo y respiratorio, problemas en el sistema inmune y endocrino, y trastornos en la visión y audición, tienen menor penetrancia entre los individuos con SD (Kaminker y Armando, 2008; Shott, 2006).

Aunque está ampliamente aceptado que los distintos fenotipos de las personas con SD se deben principalmente a la presencia de una copia extra del HSA21, aún se desconocen los mecanismos moleculares que dan lugar a estas alteraciones.

Existen dos hipótesis que tratan de explicar cómo la trisomía del HSA21 provoca el síndrome Down. La hipótesis de la *“dosis génica”* postula que la causa directa de los rasgos fenotípicos del SD es la sobreexpresión de ciertos genes en trisomía que son sensibles a la dosis génica (Epstein, 1990; Pritchard y Kola, 1999). Por otro lado, la hipótesis de *“la amplificación de la inestabilidad del desarrollo”* propone que el desequilibrio producido por la existencia de un número anormal de cromosomas ocasiona una alteración de la homeostasis del desarrollo, originándose efectos debidos a la sobreexpresión de genes, independientemente de cuáles sean éstos en concreto. De este modo el tamaño de la región cromosómica triplicada guardaría correlación con el grado de disfunción cognitiva. Ambas hipótesis no son mutuamente excluyentes. Así, se ha llegado a proponer un modelo híbrido que plantea que ciertos genes críticos tienen poco o ningún efecto de forma aislada, pero que ejercen un efecto visible en el fenotipo al combinarse con los pequeños efectos de otros muchos genes desregulados (Reeves et al., 2001).

Atendiendo a todo lo mencionado anteriormente, actualmente se acepta que aunque la sobreexpresión de un gen determinado puede tener un papel prioritario en la aparición de un fenotipo concreto, los fenotipos en el SD no son consecuencia de la triple presencia de un único gen sensible a la dosis, sino de las interacciones en los patrones de expresión de genes localizados en el HSA21 o en otros cromosoma (Antonarakis et al., 2004). Esto se explica por la influencia de elementos genéticos no codificadores y por un conjunto de influencias epigenéticas. Este desequilibrio podría afectar a mecanismos celulares y ser responsable de la variabilidad de fenotipos presentes en individuos SD.

Las personas SD presentan numerosas alteraciones en la estructura y función del Sistema Nervioso Central (SNC) (Bartesaghi et al., 2011; Rueda et al., 2012). El estudio de dichas alteraciones puede ser de utilidad para establecer una correlación entre ellas e intentar explicar el trastorno cognitivo propio de este síndrome.

1.2.1. Alteraciones morfológicas cerebrales

Estudios realizados mediante técnicas de neuroimagen revelaron que el volumen del cerebro de personas con SD está reducido (Schmidt-Sidor et al., 1990a). El cerebro de las personas adultas es más pequeño (una reducción superior al 20%) que el resto de la población, incluso cuando se corrige la medida en función de su menor tamaño corporal (Kemper et al., 1991). Esta reducción se aprecia ya durante la gestación (4-5 meses) y se acentúa durante los tres últimos meses (Engidawork y Lubec 2003; Guihard-Costa et al., 2006). También en personas jóvenes y adultas se observa esta disminución del cerebro en su conjunto: cerebelo, tronco cerebral, lóbulos frontales, parietales y temporales, así como estructuras del hipocampo (Tabla 1). En cambio, presentan un volumen normal de estructuras subcorticales y ganglios basales (Kates et al., 2002; Pinter et al., 2001). Estos cambios en el cerebro pueden tener una relación con algunas de las manifestaciones típicas del síndrome.

La hipoplasia de determinadas zonas del cerebelo, ya observadas en las primeras etapas del desarrollo, puede ser responsable de la hipotonía, el retraso en la coordinación motora y algunas de las dificultades del habla, como los problemas de articulación e inteligibilidad. Es también constante la reducción en determinadas áreas de la corteza prefrontal, lo que puede explicar los problemas en la memoria operativa, en la falta de atención y en la menor capacidad para cambiar de tarea, con mayor tendencia a tener una conducta repetitiva. Son más irregulares y variables los cambios observados en la región parietal y temporal, lo que podría explicar la gran variabilidad que se aprecia en el desarrollo del lenguaje entre individuos SD (Contestabile et al., 2010).

Región cerebral	Recién nacidos	Adolescente (7-16 años)	Adultos (20-50 años)	Ancianos (más de 50 años)
Cerebro completo	Reducido o casi normal	Reducido	Reducido	Reducido
Corteza prefrontal	Reducida	Reducida	Reducida	Reducida
Corteza parietal	Normal o reducida	Normal o reducida	Reducida	Reducida
Corteza Temporal	Variable según la circunvolución y el individuo	Variable según la circunvolución y el individuo	Variable según la circunvolución y el individuo	Reducción en cíngulo posterior y corteza entorrinal
Hipocampo	Reducido	Reducido	Reducido	Reducido
Amígdala	Reducido	-----	Reducido	Reducido
Tronco cerebral	Reducido	Reducido	Variable	Reducción en <i>locus coeruleus</i>

Tabla 1. Alteraciones anatómicas cerebrales más características del SD. Modificada de Dierssen et al., 2012.

1.2.2. Alteraciones en neurogénesis

Las personas con SD presentan un número de neuronas inferior al resto de la población en diversas áreas del SNC. Estudios recientes sugieren que, en trisomía, hay una alteración de la regulación del ciclo celular mitótico de los precursores neuronales, y que esta desregulación puede ser la base de la reducción del número de neuronas en el cerebro SD. Estos mismo defectos se han encontrado en modelos animales de SD (Contestabile et al., 2007). Estudios realizados *in vitro* en neuronas corticales de cerebros fetales SD, también demuestran defectos en la diferenciación neuronal, lo que parece contribuir al menor número de neuronas (Bahn et al., 2002; Esposito et al., 2008).

Los defectos cognitivos característicos de las personas SD pueden deberse tanto a las anomalías en el tamaño del cerebro, como ya se ha mencionado en el apartado anterior, como al número reducido de neuronas corticales (Coyle et al., 1986; Schapiro et al., 1989; Sylvester 1983), lo que posteriormente influirá en los procesos de sinaptogénesis, conectividad neuronal, plasticidad sináptica y en las habilidades cognitivas.

El hecho de que esta hipocelularidad se pueda observar en niños e incluso en fetos SD (Pinter et al., 2001; Schmidt-Sidor et al., 1990b; Sylvester, 2008), hace pensar que esta hipoplasia del cerebro se debe a un trastorno en el proceso de neurogénesis, más que a un proceso neurodegenerativo (Contestabile et al., 2007).

1.2.3. Alteraciones morfológicas neuronales. Alteraciones en espinas dendríticas

Está bien descrito que en niños SD recién nacidos y menores de 4-6 meses, la arborización dendrítica y la longitud de las dendritas basales y apicales no presentan deficiencias con respecto a niños euploides de la misma edad, incluso pueden estar ligeramente aumentadas. Es a partir del año de vida cuando esta tendencia revierte y llega a convertirse en un déficit que se mantiene a lo largo del tiempo (Becker et al., 1986; Takashima et al., 1981).

Los defectos morfológicos dendríticos también se manifiestan a nivel de las espinas dendríticas, pequeñas protrusiones emergentes de la dendrita que constituyen los elementos postsinápticos de la mayoría de las sinapsis excitatorias en el SNC. Las espinas dendríticas son estructuras altamente dinámicas, y muestran gran variedad en cuanto a tamaño y forma, estando dichos parámetros relacionados con su participación en procesos de plasticidad sináptica.

De forma normal, la arborización dendrítica y el número de espinas aumentan desde el nacimiento hasta los 15 años, y es a partir de los 20 cuando comienzan a disminuir lentamente. En cambio en los individuos SD, la arborización dendrítica y el número de espinas aumentan de forma lenta en niños, y rápidamente degeneran en adultos (Takashima et al., 1981, 1989). De hecho, la longitud y las ramificaciones de las dendritas, así como la densidad de espinas, está reducida en el hipocampo y corteza cerebral de personas adultas SD mostrando dendritas más cortas y menos ramificadas (Becker et al., 1986; Ferrer y Gullotta, 1990).

Además de la reducción en el número de espinas dendríticas, la morfología de las mismas está alterada en las personas SD (Fig. 2), observándose algunas espinas especialmente largas, con perfil tortuoso. Este patrón de espinas es un rasgo muy típico

de una disgenesia de las espinas, lo que puede indicar que se trata de un proceso degenerativo posnatal (Marin-Padilla, 1972, 1976).

Como se acaba de mencionar, los cambios en número, tamaño y forma de las espinas dendríticas están relacionados con plasticidad sináptica, existiendo una gran correlación entre el tamaño de la cabeza de la espina y la eficacia de la sinapsis, presumiblemente por el aumento de receptores de ácido α -amino 3-hidroxi 5-metil 4-isoxazol propiónico (AMPA) en espinas más grandes (Tada y Sheng, 2006). Además, la longitud y el diámetro del cuello de la espina influyen en el grado y dinámica de la elevación de calcio postsináptico mediada por la activación de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Tada y Sheng 2006). Teniendo todo ello en cuenta, cabe pensar que las alteraciones de estos micro-compartimentos neuronales tienen un impacto decisivo en la actividad neuroquímica y funcional de las redes sinápticas en el SD (Contestabile et al., 2010).

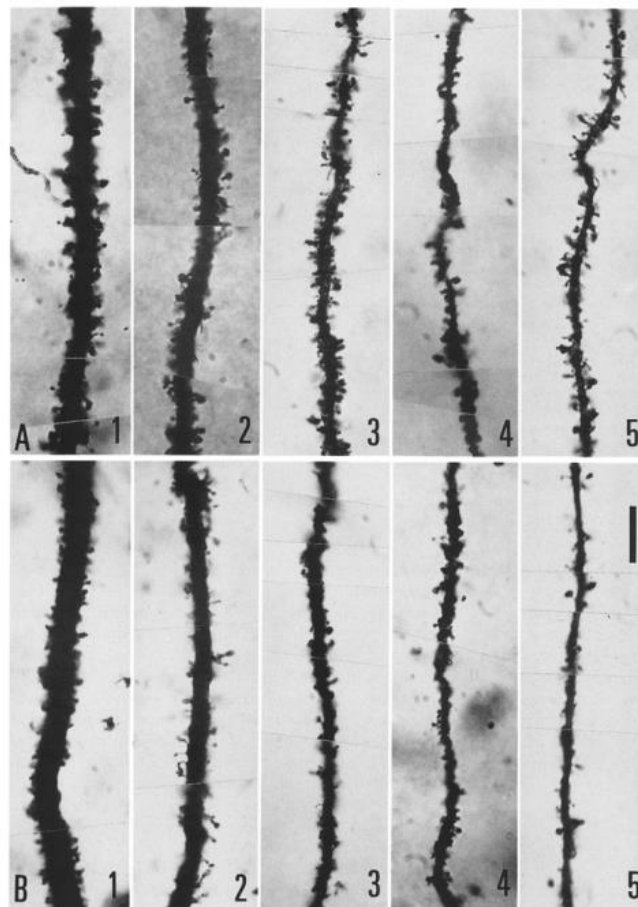


Figura 2. Representación de segmentos dendríticos de neuronas piramidales de la región CA1: A) persona con 35 años sin trisomía y B) segmentos similares en una persona de la misma edad con SD. Se observa un menor número de espinas dendríticas en el caso de la persona con. Tomado de Ferrer y Gullota et al., 1990.

En resumen, la hipocelularidad, así como las anomalías en la ramificación de las dendritas y en el número y morfología de espinas dendríticas, producen un marcado deterioro del número y eficacia de las sinapsis en el cerebro de individuos SD, dando lugar a una pérdida de plasticidad cerebral, proceso esencial que subyace al aprendizaje y la memoria (Koo et al., 1992; Wisniewski y Rabe, 1986).

1.2.4. Déficits cognitivos: memoria y aprendizaje

En los seres humanos los mecanismos más importantes a través de los cuales el medio altera la conducta son el aprendizaje y la memoria. El aprendizaje es la adquisición de nueva información o conocimiento, siendo la memoria la retención de la información aprendida.

La discapacidad intelectual es el rasgo más sobresaliente del SD. Este término hace referencia a las limitaciones que presentan estas personas, no sólo en el funcionamiento intelectual, sino también en la conducta adaptativa que se manifiesta en las habilidades sociales y cotidianas.

El coeficiente intelectual de una persona con SD varía entre 30 y 80, y en la actualidad la media se encuentra en torno a 50. A partir de la adolescencia, el coeficiente intelectual comienza a declinar. Asimismo, la velocidad de aprendizaje en su conjunto es menor que en el resto de la población (Carr y Collins, 2014). Por otra parte, está bien descrito que las personas SD muestran dificultades para retener información, tanto por las limitaciones al recibirla y procesarla (memoria a corto plazo), como al consolidarla y recuperarla (memoria a largo plazo).

Memoria a corto plazo

En diferentes estudios se ha comprobado que las personas con SD obtienen peores puntuaciones en las tareas de memoria a corto plazo (STM) que otros grupos con retraso mental, en concreto, en memoria verbal, evaluada mediante la repetición de dígitos (Jarrold y Baddeley, 1997; Numminen et al., 2001). En cuanto a la capacidad de memoria visoespacial a corto plazo, se encuentra relativamente conservada para tareas que requieren bajo control, o cuando los componentes visual y espacial son probados de manera separada. En tareas de reconocimiento, donde aumenta la carga de memoria o

se combinan las demandas visuales y espaciales, se aprecian más los déficits en las personas SD (Lanfranchi et al., 2004; Visu-Petra et al., 2007).

Memoria a largo plazo

La memoria a largo plazo (LTM) es un sistema de memoria que almacena todo lo que conocemos acerca de nosotros y del mundo que nos rodea. Dentro de memoria a largo plazo hay que diferenciar entre memoria implícita o de procedimiento y memoria explícita o declarativa (Fig. 3).

- La memoria implícita o procedimental es un tipo de memoria en la que las experiencias previas ayudan a la ejecución de una tarea sin que exista la percepción consciente de dichas experiencias. Este tipo de proceso cognitivo requiere poca atención, pues opera de forma automática (Bussy, Charrin, Brun, Curie, & des Portes, 2011). En el SD este tipo de memoria parece estar menos afectado que la memoria explícita, ya que se apoya en estructuras y circuitos cerebrales diferentes (Fig. 3). Una de dichas estructuras es el estriado (Teichmann et al., 2006) que se encuentra bien conservado en el SD. En cambio, otras estructuras importantes son el cerebelo y las áreas motoras del lóbulo frontal, que sí están afectadas en el SD, lo que contribuye al deterioro de este tipo de memoria en esta población (Bussy et al., 2011a).
- La memoria explícita o declarativa es la recopilación consciente e intencional de información y experiencias previas. Este tipo de memoria requiere los procesos de codificación, consolidación de la información y la recuperación de los recuerdos, así como un alto grado de atención. Las personas con SD muestran un deterioro acusado en su memoria explícita, con una pobre codificación de la información, una capacidad de recuperación deteriorada y déficits de consolidación (Carlesimo et al., 1997; Vicari et al., 2000). Estos déficits se deben a las alteraciones presentes en ciertas áreas del cerebro como la corteza prefrontal y los lóbulos temporales, sobre todo el hipocampo (Lott y Dierssen, 2010). El hipocampo es un elemento integrador que recibe la información desde las áreas asociativas corticales y la transforma y consolida mientras que la corteza prefrontal se encarga de almacenar la información, relacionarla y dotarla de significado (Fig.3).

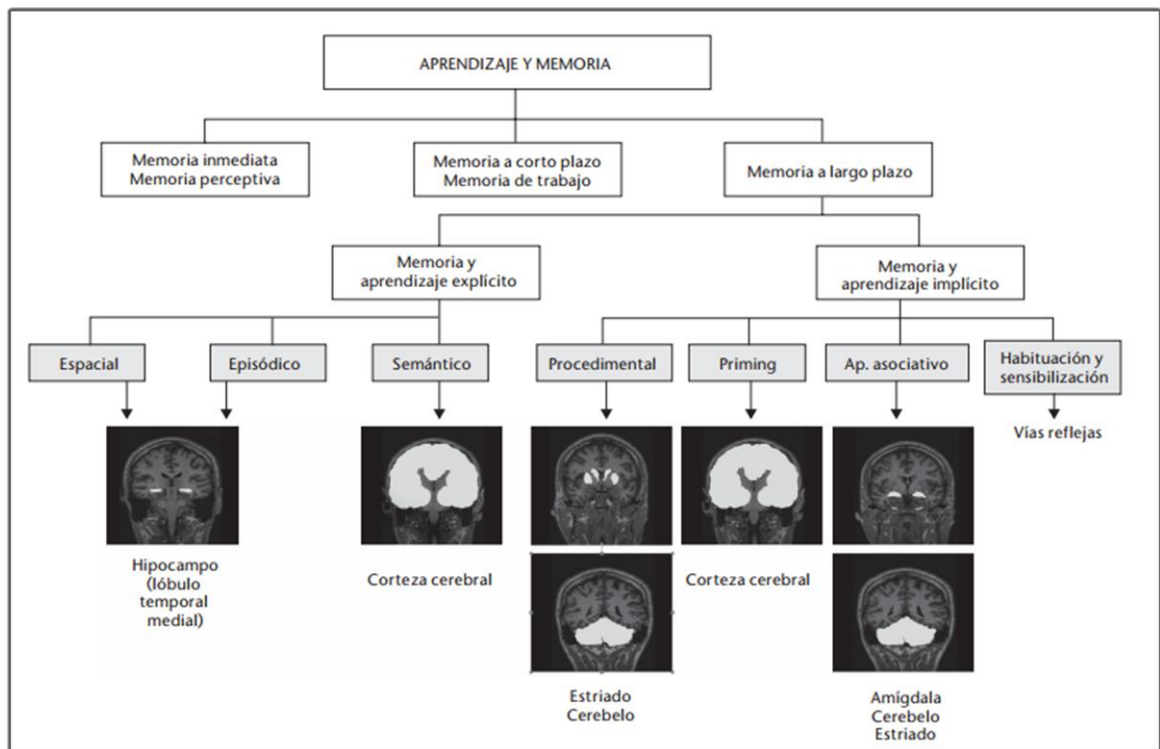


Figura 3. Clasificación integradora del aprendizaje y la memoria, y las principales áreas cerebrales implicadas en dichos procesos. Modificado de Squire, 2004.

Las funciones que aparecen más afectadas en las personas con SD son las que dependen del hipocampo y las relacionadas con la corteza prefrontal. Debido a su interrelación con otras estructuras subcorticales, las alteraciones del hipocampo (cuyo tamaño está disminuido en el SD) contribuyen a explicar la menor capacidad cognitiva y de atención, y podrían explicar las alteraciones en la memoria a largo plazo en el SD. En este trabajo nos centramos en el hipocampo, por lo que a continuación se hará una breve descripción anatómica del mismo.

1.3. El Hipocampo

Constituye, junto con el sistema olfatorio, uno de los dos tipos de corteza cerebral, denominada allocórtex por su organización en tres o cuatro capas bien definidas, en oposición al neocórtex, que casi siempre se organiza en seis. Es una de las estructuras más estudiadas del cerebro de los mamíferos, tanto por su importancia en los procesos

de aprendizaje y memoria, como por su extraordinariamente bien ordenada organización cito-arquitectónica. Aunque existen varias terminologías usadas indistintamente para nombrar las distintas partes que lo componen, la región del hipocampo incluye dos grupos de estructuras corticales diferenciadas: por un lado, la formación hipocampal y por otra parte, la región parahipocampal.

Brevemente, la región parahipocampal está compuesta por cinco áreas diferentes: las cortezas perirrinal, entorrinal y postrrinal, el presubiculo y el parasubiculo. A nivel de conectividad, la corteza entorrinal se considera el eje principal de la región parahipocampal, ya que recibe y envía multitud de conexiones recíprocas con la formación hipocampal así como con las otras áreas parahipocampales adyacentes (Fig.4).

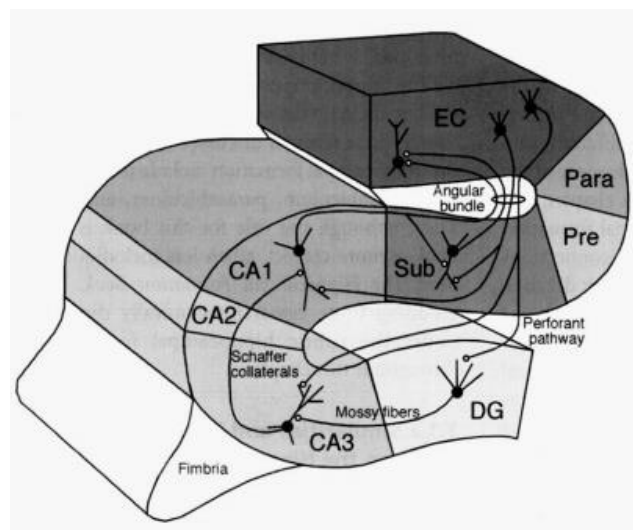


Figura 4. Principales conexiones en la formación hipocampal. Se muestra la vía perforante (*Perforant pathway*), donde las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal proyectan hacia el subículo y terminan en el giro dentado y en la CA3, las fibras musgosas (*Mossy fibers*) del giro dentado proyectando sobre las células piramidales de la región CA3, y las colaterales de Schaffer que proyectan desde CA3 a CA1, cuyas células conectan a su vez con el subículo y la corteza entorrinal. Tomado de Andersen, 2007.

La formación hipocampal ha sido dividida en varias regiones desde antiguo por diversos autores. Las tres principales subregiones comparten una “elegante” organización laminar de los somas y árboles dendríticos de sus neuronas, presentando

una disposición en forma de dos herraduras enfrentadas y parcialmente superpuestas, donde los axones aferentes terminan en regiones específicas de la estructura laminar, sea el soma o las distintas partes de los árboles dendríticos. Así Ramón y Cajal distinguió entre el giro dentado y el hipocampo propiamente dicho (*hipocampus proper*) destacando en este último las regiones superior e inferior. Rose dividió al conjunto en cinco partes (h1-5), pero finalmente fue Lorente de Nó quién estableció una nomenclatura que se sigue utilizando a día de hoy. Así, distinguió entre el giro dentado y la región denominada cuerno de Amón (abreviada como región "CA", por su estructura retorcida similar al cuerno de un carnero, presente en la cabeza del dios egipcio Amón) dividida a su vez en las regiones CA1 (región superior de Cajal) y CA3 (región inferior), unidas ambas por la pequeña región de transición CA2. Cada una de estas regiones, se distinguen tanto desde el punto de vista cito-arquitectónico (tamaño celular y morfología del árbol dendrítico), como desde el punto de vista genético-bioquímico (expresan diversas proteínas diferencialmente) y, cómo no, por su significación funcional (características electrofisiológicas y patrones de conectividad diferenciales) (Watson et al., 2012).

De forma muy simplificada, las conexiones entre la formación hipocampal y la región parahipocampal se presentan clásicamente como un circuito trisináptico. La entrada principal de información está constituida por los axones de la vía perforante, que dirigen información sensitiva polimodal desde neuronas en la capa II de la corteza entorrinal hacia el giro dentado. Estos axones forman sinapsis excitatorias con las dendritas de las células granulares del giro dentado (en particular, las cortezas entorrinal lateral y medial inervan el tercio externo y el tercio medio, respectivamente, del árbol dendrítico de las células granulares). Subsiguientemente, el giro dentado, a través de los axones de sus células granulares (conocidos como fibras musgosas) establece contactos sinápticos sobre la parte proximal de las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la región CA3, quienes por su parte envían axones, a través de las conexiones comisurales, a las células piramidales de las regiones CA3 y CA1 del hemisferio cerebral contralateral y adicionalmente desdoblan ramas colaterales a la región CA1 ipsilateral (denominados estos últimos colaterales de Schaffer).

Adicionalmente la corteza entorrinal inerva de forma directa, desde las células de su capa II, a las células piramidales de CA3, y desde células de su capa III al tercio distal de las dendritas apicales de CA1 (Neves et al., 2008) (Fig. 5).

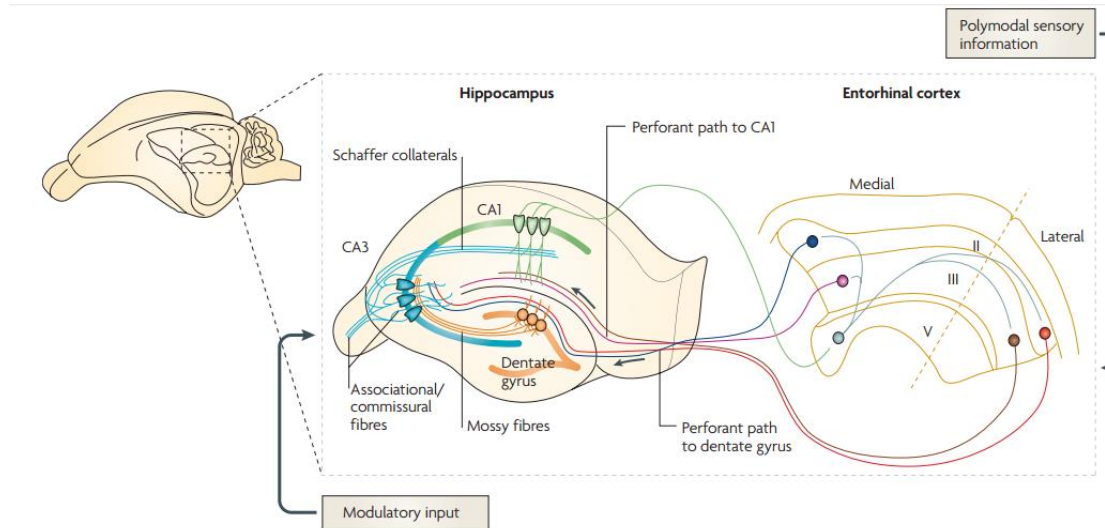


Figura 5. Circuito trisináptico del hipocampo. Se muestran las principales regiones del mismo (CA1, CA3 y Giro dentado (DG)) y se ejemplifican las sinapsis del circuito trisináptico. Tomado de Neves et al., 2008.

Además de estos circuitos, existe una densa red de conexiones asociativas interconectando las células CA3 del mismo hemisferio, una amplia diversidad poblacional de interneuronas inhibitorias por todo el hipocampo, así como una importante entrada de aferencias moduladoras desde otras regiones cerebrales.

1.4. Modelos murinos de síndrome de Down. El ratón Ts1Cje como modelo de estudio

Las personas SD muestran discapacidad intelectual y déficits cognitivos que dificultan su calidad de vida y su autonomía. Con el fin de estudiar con mayor profundidad los problemas neurobiológicos relacionados con los déficits de memoria de los individuos SD, se generaron modelos animales. Estos modelos están ayudando a esclarecer los mecanismos moleculares y celulares implicados en las deficiencias de

memoria y aprendizaje, y a proponer posibles tratamientos que mejoren la calidad de vida de las personas SD.

De los 552 genes que contiene el HSA21, 166 son ortólogos a los genes localizados en regiones sinténicas de los cromosomas de ratón 16 (MMU16), 17 (MMU17) y 10 (MMU10): 110 genes en MMU16, 19 genes en MMU17 y 37 genes en MMU10 (Sturgeon y Gardiner, 2011). Por tanto, resulta muy complicado obtener un modelo murino de SD completo, por lo que se han desarrollado diversos modelos portadores de trisomías parciales (Fig. 6).

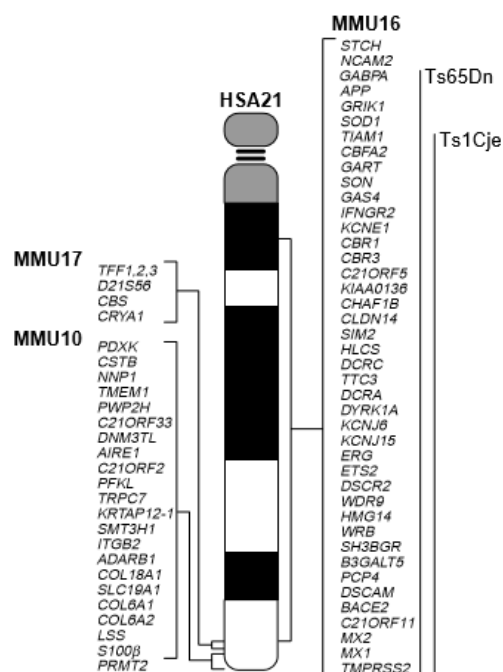


Figura 6. Localización de genes del HSA21 en los cromosomas MMU16, 17 y 10. Se muestran también las regiones del MMU16 que están en trisomía en los modelos murinos de SD Ts65Dn y Ts1Cje. Tomado de Reeves et al., 2001.

A pesar de tratarse de modelos de SD parciales, hay evidencias claras que indican que los rasgos más característicos del fenotipo Down se observan también en estos ratones (Tabla 2).

Actualmente, el ratón más utilizado y por ello mejor caracterizado es el modelo Ts65Dn. Si bien es cierto que este ratón muestra un fenotipo más severo que otros modelos de SD, recientemente se ha descubierto que presenta 60 genes adicionales en trisomía que

no son ortólogos a los localizados en el HSA21 (Duchon et al., 2011), lo que podría cuestionar algunas de las conclusiones obtenidas utilizando este modelo.

ALTERACIONES	SD HUMANO	Ts1Cje	Ts65Dn
Volumen cerebral	Reducido	Reducido	Reducido
Densidad neuronal	Reducida	Reducida	Reducida
Neurogénesis	<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones en la proliferación de precursores neurales • Retraso del ciclo celular • Alteraciones en neurodiferenciación • Alteraciones en neurogénesis cerebelar 	<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones en la proliferación de precursores neurales • Retraso del ciclo celular • Alteraciones en neurodiferenciación • Alteraciones en neurogénesis cerebelar 	<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones en la proliferación de precursores neurales • Retraso del ciclo celular • Alteraciones en neurodiferenciación • Alteraciones en neurogénesis cerebelar
Dendritas y espinas	<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones en la morfología • Densidad reducida 	<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones en la morfología • Densidad reducida 	<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones en la morfología • Densidad reducida
Electrofisiología	<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones EEG • Alteraciones en los potenciales evocados 	<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones en LTP hipocampal 	<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones en LTP hipocampal
Balance excitación-inhibición	<ul style="list-style-type: none"> • Niveles reducidos de GABA en fetos • Niveles reducidos de glutamato y aspartato en adultos 	<ul style="list-style-type: none"> • Redistribución de las sinapsis inhibitorias 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento del número de sinapsis inhibitorias • Disminución del número de sinapsis excitatorias • Redistribución de las sinapsis inhibitorias • Aumento del número de interneuronas GABAérgicas • Alteraciones en la estructura del receptor GABA
Cognitivos-conductuales	<ul style="list-style-type: none"> • Retraso en el desarrollo • Hiperactividad ocasional • Atención reducida • Alteración del aprendizaje • Alteración de la memoria • Adquisición tardía de habilidades motoras • Habilidades lingüísticas alteradas 		

Tabla 2. Características fenotípicas comunes entre personas con SD y los ratones Ts1Cje y Ts65Dn.
Modificado de Rueda et al., 2012.

En el ratón Ts1Cje el segmento del MMU16 en trisomía es más pequeño que en el modelo Ts65Dn (Fig. 6), pero suficiente para mostrar un fenotipo similar al humano SD, incluyendo la disfunción hipocampal (Tabla 2). El modelo Ts1Cje se generó de manera fortuita, al intentar generar un ratón mutante para el gen SOD1, que resultó en una translocación parcial del MMU16 (abarcando desde SOD1 hasta MX1) sobre el MMU12 (Sago et al., 1998).

A diferencia del ratón Ts65Dn, en el que los machos son estériles, ambos sexos son fértiles en el modelo Ts1Cje, y el porcentaje de animales con la trisomía que resultan en un cruce de un animal silvestre con otro trisómico es del 50%, siendo solo un 25% en el caso Ts65Dn. Los ratones Ts1Cje no muestra ninguna malformación facial ni de extremidades, ni cualquier otra características dismórfica (Sago et al., 1998).

A continuación se indican, de forma resumida, las alteraciones neuromorfológicas del ratón Ts1Cje y su correlación con las presentes en personas SD.

1.4.1. Alteraciones en el cerebro

Estudios anteriores han demostrado que efectivamente, al igual que en humano SD, el modelo Ts1Cje también muestra un volumen reducido del cerebro desde estadios tempranos de gestación. Sin embargo en ratones adultos no se aprecia dicha disminución (Aldridge et al., 2007; Belichenko, et al., 2007). En el ratón Ts1Cje, el hipocampo no está reducido de tamaño, siendo el cerebelo (estructura implicada en la coordinación motora y en procesos cognitivos como la atención, flexibilidad cognitiva y la memoria) una de las estructuras más afectadas (Belichenko et al., 2007).

1.4.2. Alteraciones en la neurogénesis

Al igual que en el SD humano, la neurogénesis está también afectada en los ratones Ts1Cje. Así, se observa una disminución en la proliferación celular de precursores neuronales, estando afectado el ciclo celular y alterada la diferenciación en el neocórtex y la zona subventricular (Hewitt et al., 2010; Ishihara et al., 2010; Moldrich et al., 2009). Además, en ratones adultos de 3 meses se ha observado una disminución severa de la neurogénesis en la zona subgranular del giro dentado (SGZ). La

neurogénesis adulta en el hipocampo parece estar implicada en el establecimiento de la potenciación a largo plazo (LTP), y tener un papel importante en los procesos de memoria y aprendizaje (Abrous y Wojtowicz, 2015; Shors, Townsend et al., 2002).

1.4.3. Alteraciones en la morfología dendrítica

El desarrollo anómalo de las estructuras dendríticas es una marca distintiva de muchas formas de discapacidad intelectual, incluido el SD (Benavides-Piccione et al., 2004). Al igual que en humanos SD, el ratón Ts1Cje muestra alteraciones no solo en la densidad de espinas, sino también en la forma y tamaño de las mismas (Belichenko et al., 2004). Hay una disminución del número de espinas en el giro dentado, aumento en el tamaño de la cabeza de las espinas y disminución en la longitud del cuello. Sin embargo, al igual que en otros modelos animales de SD, hay otros parámetros que no cambian, como son: la anchura de las dendritas, la densidad de espinas en la corteza motora (excepto la capa II y III apical) y en la región CA1 del hipocampo (Belichenko et al., 2007).

1.4.4. Alteraciones en la plasticidad sináptica

Todas estas anomalías en espinas y dendritas generan una red de conexiones neurales anormal que limita el procesamiento de la información, disminuye la plasticidad sináptica y da lugar al déficit cognitivo característico del SD (Lott y Dierssen 2010; Williams et al., 2005; Wishart 2007).

La plasticidad sináptica refiere a la naturaleza dinámica de la sinapsis, cuya estructura, composición y función cambia en respuesta a la actividad de la red neuronal. Dependiendo del tiempo y del nivel de actividad pre y postsináptica, la sinapsis puede aumentar o disminuir su eficacia, proporcionando un posible mecanismo para la formación y almacenamiento de la memoria.

Un modo de analizar la plasticidad sináptica en el hipocampo es el registro y medición de la LTP. Existen diversos tipos de LTP, con diferentes mecanismos moleculares implicados en su generación. Una de las principales formas de LTP es la dependiente de NMDA, siendo el glutamato el neurotransmisor responsable de la

misma. Estos receptores facilitan la entrada de Ca^{++} en el elemento postsináptico, así como la activación de vías de señalización que promoverán la eficacia sináptica. Junto a la LTP existe un fenómeno inverso, la depresión a largo plazo (LTD), promovida en muchas ocasiones por el ácido γ -aminobutírico (GABA).

En el ratón Ts1Cje, se ha observado una disminución de la LTP y un aumento de la LTD en la región CA1 en rodajas de hipocampo (Siarey et al., 2005). Nuestro laboratorio, en colaboración con el grupo de investigación dirigido por el Dr. Antonio Rodríguez Moreno (Universidad Pablo de Olavide, Sevilla) también ha establecido recientemente que la potenciación dependiente de BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) o BDNF-LTP está completamente abolida en la CA1 de ratones Ts1Cje (Andrade-Talavera et al., 2015).

1.4.5. Déficits de memoria y aprendizaje

Entre las distintas utilidades de los *test* de comportamiento, una de ellas es evaluar defectos en regiones específicas del cerebro, de acuerdo con las funciones que les son atribuidas en la realización de determinadas tareas. De todos ellos, las pruebas de aprendizaje y memoria espacial, así como de reconocimiento de objetos han sido los más extensamente estudiados en modelos murinos de SD. Estos *test* han ayudado a definir el papel de ciertas regiones del cerebro que están especialmente afectadas en los ratones modelo de SD, y en algunos casos se han podido trasladar de forma exitosa a *test* de comportamiento realizados en personas SD (Tabla 3). Estos *tests* son además de gran utilidad para evaluar la eficacia de distintos compuestos farmacológicos en el tratamiento del SD.

Al igual que ocurre en el SD (Nadel, 2003), a nivel cognitivo los ratones Ts1Cje tienen dificultades en la realización de tareas que dependen del hipocampo, estructura implicada en la memoria espacial, como se ha observado en las pruebas del laberinto "*Morris Water Maze*", consiste en una piscina redonda con una plataforma oculta justo debajo de la superficie del agua. Durante una primera fase el ratón aprende a localizar la plataforma oculta para escapar del agua ayudado con unas señales visuales externas. El día del test, se suprime la plataforma y se mide la distancia recorrida y el tiempo que

pasa el ratón en el cuadrante donde originalmente estaba la plataforma, evaluando así la respuesta del animal a esta nueva situación (Fig.7) (Sago et al., 1998).

Test comportamiento	Región del cerebro asociada a la tarea	Modelo Ts1Cje
<i>Object recognition test</i>	corteza perirrinal, corteza prefrontal, hipocampo, corteza insular	Normal
<i>T-maze</i>	hipocampo, <i>septum</i> , corteza prefrontal, tálamo, cerebelo	Afectado
<i>Morris Water Maze</i> con plataforma oculta	hipocampo, <i>locus coeruleus</i> , corteza entorrinal, tálamo, estriado, <i>septum</i> , complejo subicular, corteza parietal	Afectado
<i>Morris Water Maze</i> con plataforma visible	ganglios basales, estriado, corteza parietal	Normal

Tabla 3. Test de comportamientos llevados a cabo en el modelo Ts1Cje. Se indican las regiones del cerebro implicadas en la correcta realización de cada *test* de memoria y aprendizaje. Modificada de Ishita Das y Roger H.Reeves. 2011.

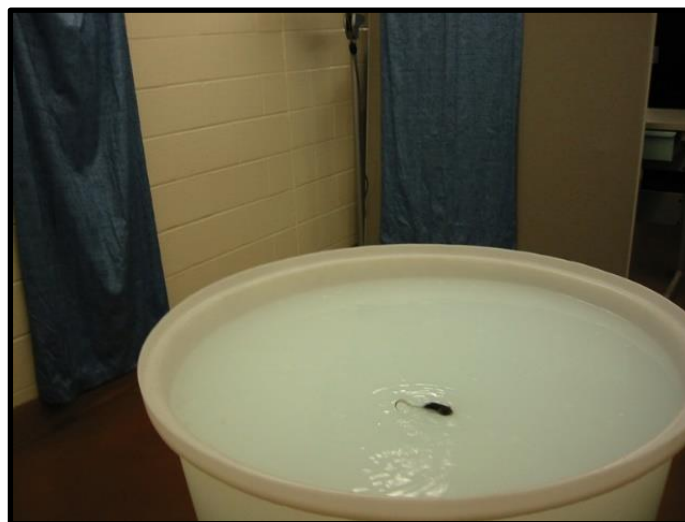


Figura 7. Test de “Morris Water Maze”. Tomado de <http://www.cidd.unc.edu>

En cuanto a memoria a corto plazo o de trabajo, el ratón presenta déficits en las pruebas de alternancia espontánea en el laberinto en forma de T (Fig. 8). Hay muchas variaciones de este *test*, y estas variaciones pueden ser útiles para enfatizar funciones de distintas regiones del cerebro. En su versión de “libre exploración”, basada en la tendencia natural de los roedores de explorar los elementos nuevos, se valoró la visita de un brazo del laberinto distinto al que ya había sido explorado. Diversos modelos murinos de SD, entre ellos el Ts1Cje, mostraron un porcentaje más bajo de alternancias (50-60%) comparados con los ratones control euploides (70-80%) (Belichenko et al., 2007; Fernandez y Garner, 2007).

Un test similar al laberinto en forma de T, es el “*Novel Object Recognition Test*” (NORT). Al igual que el anterior, se trata de un *test* no aversivo, por lo que no está asociado a ningún castigo por fallo ni se realiza bajo condiciones que puedan generar estrés a los animales. Al igual que el laberinto en forma de T, el NORT también está basado en la tendencia innata que presentan los roedores de explorar nuevos objetos de forma preferente a los que les resultan familiares. El ratón Ts1Cje no muestra un comportamiento alterado en el NORT (Fernandez y Garner, 2007). Actualmente existe una controversia en cuanto al papel del hipocampo en la memoria del reconocimiento de objetos. Algunos autores sostienen que el hipocampo interviene concretamente en el aprendizaje del contexto en el que los objetos son colocados. Esto sugiere que esta región sería necesaria para conocer el “qué, dónde y cuándo” del escenario, o para ser capaz de distinguir la localización del objeto, pero no para el NORT propiamente dicho (Balderas et al., 2008).

En cuanto a actividad locomotora espontánea evaluada mediante el *test* de “*open-field*”, los ratones Ts1Cje muestran una baja actividad locomotora en el centro de la caja en comparación con ratones control sin trisomía, sugiriendo un comportamiento exploratorio reducido (Sago et al., 1998). Este test consiste en una caja opaca con unas medidas determinadas (40x40x32cm). El ratón se coloca durante una hora en oscuridad durante la fase de luz, se monitoriza con luz infrarroja y se mide la actividad en el centro y en la periferia de la caja (Fig. 9).



Figura 8. Test del laberinto en forma de T. Tomado de <http://www.cidd.unc.edu>



Figura 9. Test "open-field". Tomado de <http://www.cidd.unc.edu>

1.5. Implicaciones de la traducción local en plasticidad sináptica, memoria y aprendizaje

Para la consolidación de la memoria, es decir, para la conversión la memoria a corto plazo en LTM, son necesarios mecanismos moleculares de plasticidad sináptica que conllevan la síntesis de nuevas proteínas.

Como se ha dicho anteriormente, en el modelo Ts1Cje se aprecian defectos de plasticidad sináptica. Estas alteraciones podrían deberse, al menos en parte, a problemas en la síntesis de proteínas. Uno de los mecanismos clave en la producción de nuevas proteínas necesarias para modificar la eficacia de las sinapsis es la traducción local. De hecho, está bien establecido que el transporte de mRNAs y su traducción localizada en las neuritas es un proceso esencial implicado en guía axonal, dendritogénesis, sinaptogénesis y plasticidad sináptica (Kindler et al., 2005).

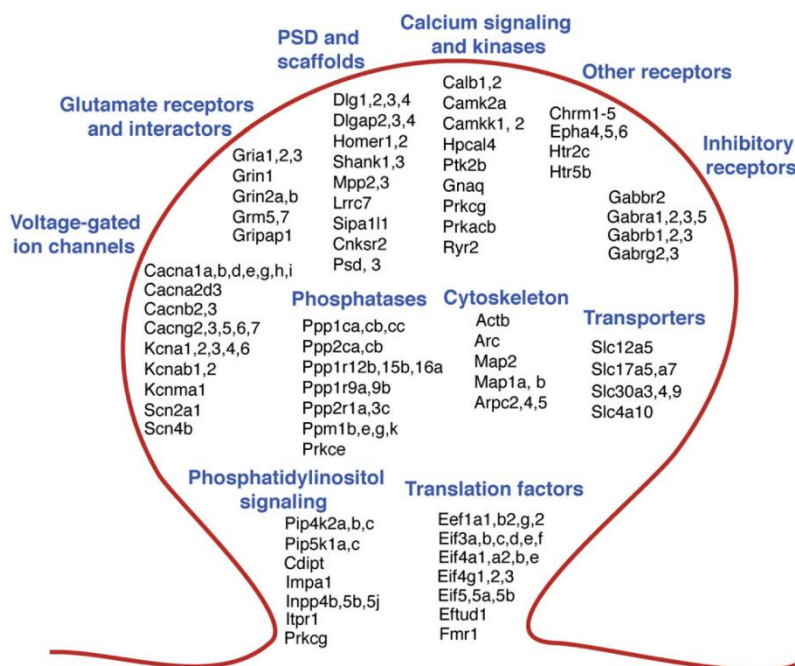


Figura 10. Familias funcionales de mRNAs identificados en el compartimento post-sináptico de neuronas de hipocampo. Se muestran algunos mRNAs de localización dendrítica relevantes para la función sináptica. Tomado de Cajigas et al., 2012.

La estimación actual de mRNAs de localización dendrítica incluye más de 2.000 transcritos (Cajigas et al., 2012), pertenecientes a distintas categorías funcionales: proteínas de citoesqueleto, receptores post-sinápticos, canales iónicos, proteínas de señalización de Ca⁺⁺, factores de iniciación y elongación de la traducción, entre otros (Fig. 10).

1.6. Regulación de la traducción local por mTOR y ERK

mTOR y ERK son dos vías de señalización estrechamente relacionadas entre sí (Fig. 11). Además de otros estímulos, el BDNF es capaz de activar estas vías para regular la tasa de traducción local dendrítica (Takei et al., 2004), así como facilitar diversos tipos de plasticidad a largo plazo (revisado Panja y Bramham, 2014).

La interacción del BDNF con su receptor TrkB (*Tropomyosin receptor Kinase B*) produce la activación de PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), capaz de activar a su vez a AKT1 (*Protein Kinase B*), ya sea de forma directa o a través de PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) (Fig. 11). AKT1 fosforila a mTOR, activándola. Además, AKT1 inhibe a TSC, un complejo inhibidor de mTOR. Por su parte, una vez activada, la quinasa mTOR puede fosforilar a las proteínas inhibidoras de la traducción 4E-BPs (*eIF4E-binding proteins*), lo que resulta en una activación de la síntesis de proteínas dependiente del factor de inicio de la traducción eIF4E. Por otra parte, mTOR puede fosforilar a p70S6K (*ribosomal protein S6 Kinase*), una quinasa que fosforila a la proteína ribosómica S6. La proteína S6 fosforilada fomenta la traducción de los denominados "TOP mRNAs", que codifican a su vez otras proteínas ribosómicas, así como factores de traducción, por lo que la activación de S6 favorece la síntesis de la maquinaria molecular necesaria para la síntesis de proteínas.

Por otra parte, el BDNF también produce la activación de la vía Ras-ERK (Fig. 11). ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) fosforila a Mnk1 (*Mitogen-activated protein kinase integrating kinase 1*), que a su vez es capaz de fosforilar a eIF4E, incrementándose así la síntesis de proteínas dependientes de dicho factor.

Estas rutas de señalización son complejas, y de hecho no constituyen dos vías completamente paralelas, sino que pueden influirse mutuamente (Fig. 11). Así, por ejemplo, ERK puede fosforilar a PDK1 (*Phosphoinositide-dependent Kinase 1*) a través de RSK (*p90 ribosomal S6 kinase*) (Frödin et al., 2000), produciendo una activación de la vía Akt-mTOR (Tsokas et al., 2007). La activación de Calpain-2 por ERK (Zadran et al., 2010) también promueve la activación de mTOR, siendo además necesaria para que se lleve a cabo la síntesis de proteínas dendríticas inducida por BDNF en el hipocampo (Briz

et al., 2013). A su vez, también PI3K influye sobre la actividad de ERK, a través de MEK (MAPK/ERK kinase) (Tsokas et al., 2007).

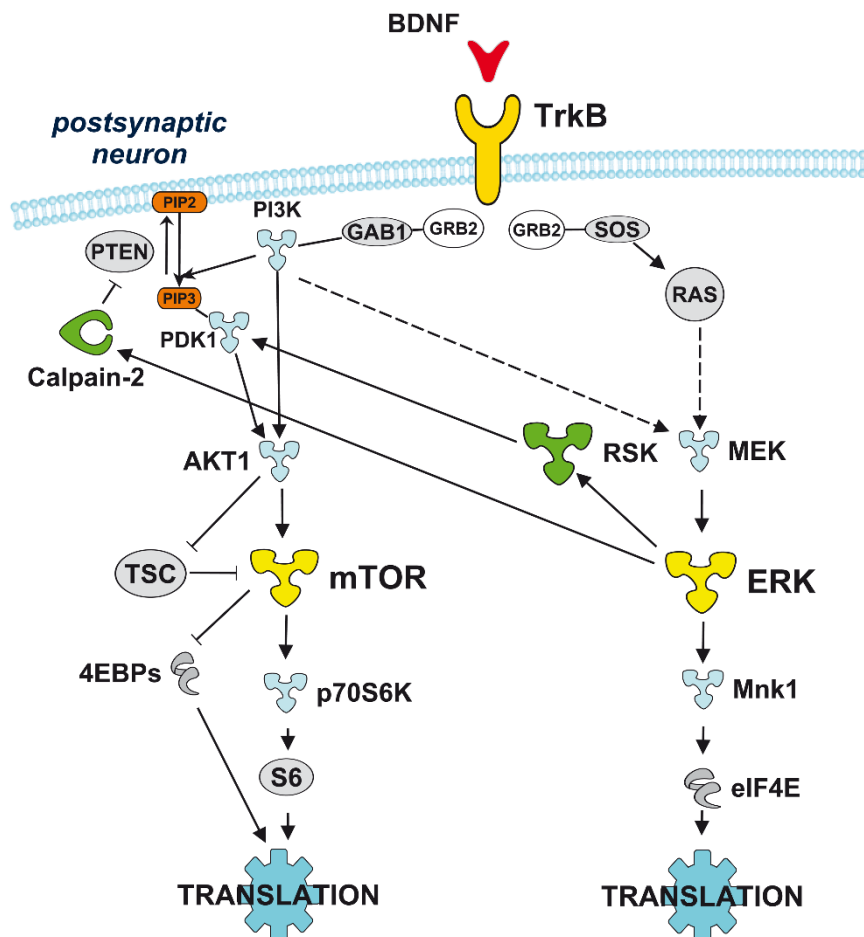


Figura 11. Regulación de la traducción local por BDNF a través de mTOR y ERK. El BDNF puede activar las vías Akt-mTOR y Ras-ERK a través de su interacción con receptores TrkB, produciendo un incremento de las tasas de traducción local. Modificado de Andrade-Talavera et al., 2015.

Diversos trabajos han puesto de manifiesto el papel relevante de mTOR como mediador de la plasticidad sináptica inducida por BDNF (Cammalleri et al., 2003; Hou y Klann, 2004; Tang et al., 2002). Resultados previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que la vía de señalización mTOR está hiperactivada en el hipocampo de ratones Ts1Cje (Troca-Marín et al., 2011). Así, los niveles dendríticos de las formas fosforiladas de AKT1, mTOR, p70S6K, S6 y 4E-BP1 están incrementados en neuronas de ratones Ts1Cje. Por otra parte, mientras que los cultivos de neuronas silvestres

responden a BDNF aumentando el nivel de fosforilación de las proteínas mencionadas anteriormente, tal y como se describe en la literatura (Takei et al., 2004), las neuronas Ts1Cje son insensibles a la adición de BDNF al cultivo. Por tanto, la hiperactivación de la vía mTOR en el hipocampo Ts1Cje supone una pérdida de capacidad de señalización a través de la misma. Esta pérdida de capacidad de señalización se debe a los niveles anormalmente elevados de BDNF y/o pro-BDNF presentes en el hipocampo de los ratones trisómicos (Troca-Marín et al., 2011), que parecen saturar la vía mTOR (aunque no la vía ERK). Como ya se ha mencionado, nuestro grupo de investigación, en colaboración (Laboratorio Dr. Antonio Rodríguez-Moreno, UPO) también ha demostrado recientemente que la LTP dependiente de BDNF en la región CA1 de hipocampo está ausente en los ratones Ts1Cje (Andrade-Talavera et al., 2015).

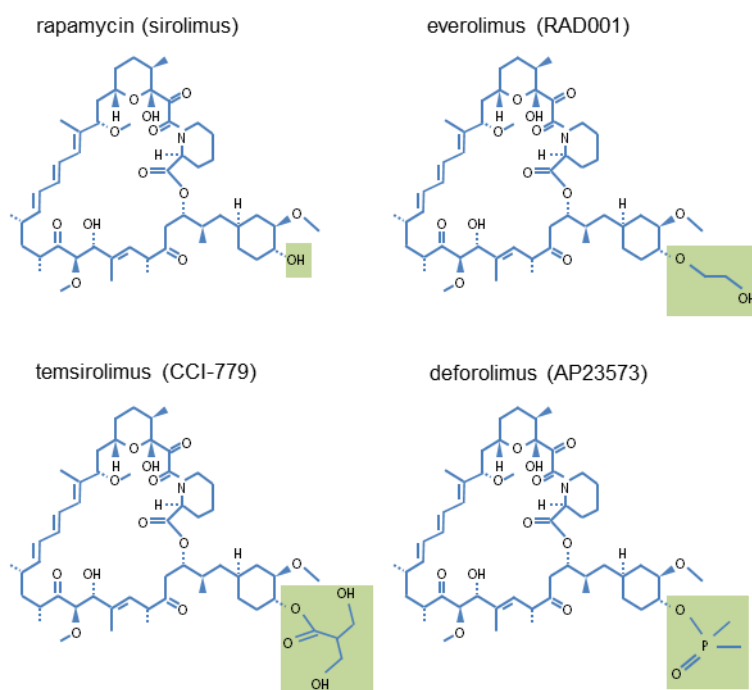


Figura 12. Estructura química de la rapamicina y otros compuestos análogos. Los recuadros muestran las diferencias entre rapamicina (sirolimus), everolimus, temsirolimus y deforolimus. Tomado de Troca-Marín et al., 2014.

La rapamicina (también conocida con el nombre de Sirolimus o Rapamune®) es un antibiótico producido por *Streptomyces hygroscopicus*. Se trata de un inhibidor específico de la fosforilación de mTOR, cuyo uso en humanos está aprobado. Actualmente la rapamicina y otros compuestos derivados (Fig. 12) se emplean como

agentes inmunodepresores en trasplantes, así como para el tratamiento de ciertos tumores.

De manera interesante, la rapamicina restaura los niveles de fosforilación normales de la vía mTOR en neuronas de hipocampo de ratones Ts1Cje, así como la tasa de traducción local (medida mediante marcaje metabólico de sinaptoneurosomas de hipocampo) (José Antonio Troca-Marín et al., 2011). La rapamicina también recupera la BDNF-LTP en rodajas de hipocampo de ratones Ts1Cje (Andrade-Talavera et al., 2015).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En el SD, al igual que en otras enfermedades que cursan con discapacidad intelectual, la morfología dendrítica y la plasticidad sináptica están afectadas. La traducción local de mRNAs dendríticos tiene un papel relevante en ambos aspectos. Como se ha descrito en la Introducción, resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que en el hipocampo del ratón modelo de SD Ts1Cje:

1. la vía de señalización mTOR está hiperactivada, produciendo un incremento de la tasa de traducción local;
2. la vía mTOR no responde a la adición exógena de BDNF, probablemente debido a la saturación de la misma;
3. la LTP dependiente de BDNF está abolida;
4. la rapamicina, un inhibidor específico de la quinasa mTOR, es capaz de revertir todos los déficits mencionados.

Dado que los efectos positivos de la rapamicina anteriormente descritos utilizando el modelo Ts1Cje se han observado en sistemas de experimentación *in vitro* o *ex vivo*, es de gran interés determinar qué ocurre *in vivo* en este modelo de SD. Es por ello que el presente estudio tiene como objetivo principal establecer si el tratamiento de ratones Ts1Cje con rapamicina mejora posibles déficits de memoria y aprendizaje, y en caso afirmativo, identificar los cambios sinápticos que produce dicho tratamiento.

Los objetivos concretos de este trabajo son, por tanto:

1. Caracterizar los déficits cognitivos del ratón Ts1Cje mediante *tests* de comportamiento y memoria. Los test utilizados serán los denominados "*object recognition*" y "*Barnes maze*".
2. Determinar si el tratamiento con rapamicina revierte los defectos cognitivos identificados en el objetivo anterior.
3. Caracterizar mediante análisis proteómico muestras de sinaptoneurosomas de hipocampo de ratones silvestres y Ts1Cje, tratados o no tratados con rapamicina, con objeto de esclarecer los mecanismos moleculares desregulados a nivel sináptico en los ratones trisómicos, así como los mecanismos responsables del posible efecto terapéutico de la rapamicina en dichos ratones.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Mantenimiento y genotipado de la colonia Ts1Cje

Los ratones se mantuvieron en las condiciones óptimas según especie, siguiendo la normativa vigente RD 53/2013 por el que se establecen “las normativas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia”. Todos los procedimientos han sido evaluados y aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla.

Los ratones Ts1Cje, procedentes de Jackson Laboratories (USA), se mantuvieron en un fondo genético híbrido, llevando a cabo cruces entre hembras C57BL/6J01aHsd x C3H/HeNHsd F1 (híbridas B6C3F1 suministradas por Harlan o Charles River) y machos Ts1Cje, tal y como recomienda el suministrador.

Los ratones fueron genotipados mediante PCR, utilizando DNA aislado a partir de biopsias de cola. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ l, conteniendo: 2 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 0,4 μ M de cada oligonucleótido (Neo-fw, Neo-rev, Tcrd-fw, Tcrd-rv), 0,04 unidades de Taq polimerasa (Biotools) y 2,5 μ l de buffer de reacción comercial (10x, Biotools).

Las secuencias de los oligonucleótidos fueron las 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

Los oligonucleótidos Neo-fw y Neo-rev amplifican una banda de 280 pares de bases (pb) sólo presente en los ratones trisómicos. Los oligonucleótidos Tcrd-fw y Tcrd-rv amplifican una banda de 200 pb presente tanto en los ratones silvestres como en los trisómicos (control positivo).

El programa de PCR utilizado constó de los siguientes pasos: desnaturalización durante 2 min a 94°C, 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 amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Esta línea de ratones puede ser portadora de una mutación en el gen *Pde6b^{rd1}*, que, en recesividad, produce degeneración de la retina. Por tanto los ratones homocigotos para dicha mutación son ciegos. Para poder descartar los ratones ciegos en los experimentos realizados, se llevó a cabo el genotipado de los mismos mediante PCR.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, conteniendo: 2 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM de cada oligonucleótido (oIMR2093, oIMR2094, oIMR2095), 0,04 unidades de Taq polimerasa (Biotools) y 2,5 µl de buffer de reacción comercial (10x, Biotools).

Las secuencias de los oligonucleótidos fueron las siguientes:

oIMR2093 (alelo mutante):	5´- AAG CTA GCT GCA GTA ACG CCA TTT
oIMR2094 (alelo silvestre):	5´- ACC TGC ATG TGA ACC CAG TAT TCT ATC
oIMR2095 (común):	5´- CTA CAG CCC CTC TCC AAG GTT TAT AG

El oligonucleótido oIMR2093, junto con el oligonucleótido oIMR2095, amplifica una banda de 560 pb presente en los ratones mutantes; el oligonucleótido oIMR2094, junto con el oligonucleótido oIMR2095, amplifica una banda de 240 pb presente en los ratones silvestres; los ratones heterocigotos muestran ambas bandas.

El programa utilizado constó de los siguientes pasos: 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, *annealing* a 65°C durante 30 s y polimerización a 72°C durante 2 min. Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

3.2. Pruebas sensoriales y motoras

Con objeto de descartar ratones con defectos sensoriales y/o motores que pudieran afectar los resultados de los *tests* de comportamiento, se llevaron a cabo

controles para evaluar el oído, olfato, sensibilidad y coordinación motora de los ratones (Crawley, 2007).

Para evaluar la audición se observó la reacción a un estímulo sonoro fuerte (palmada). Para evaluar el olfato, los animales se mantuvieron en ayunas durante 12 horas y se observó su capacidad de encontrar un pellet de comida escondido entre las virutas de la jaula. Por otra parte, la sensibilidad se comprobó aplicando un estímulo doloroso en la cola.

La coordinación motora se verificó mediante los *tests* “*vertical pole*” y “*hanging wire*”. La prueba “*vertical pole*” consiste en situar al ratón en la zona central de una varilla de madera (2 cm de diámetro y 40 cm de largo) en posición horizontal, y a continuación ir girando la varilla hacia la posición vertical (Fig. 13). Antes de alcanzar los 45° de inclinación, los ratones con problemas motores se caen de la varilla. La prueba “*hanging wire*” consiste en colocar al ratón sobre una rejilla que se sacude para estimular la reacción de agarre a la misma por parte del animal y a continuación se da la vuelta a la rejilla. En esta circunstancia, los animales que no presentan problemas motores permanecen al menos 1 min agarrados a la rejilla (Fig. 14).

Finalmente se evaluó el estado general de salud mediante curva de peso, ausencia de calvas o lesiones, buena postura al andar, etc.



Figura 13. Test de coordinación motora “*vertical pole*”. El animal se coloca en la parte central de la varilla, que se inclina 45°. Los animales con problemas motores no son capaces de permanecer agarrados a la varilla en esas circunstancias.

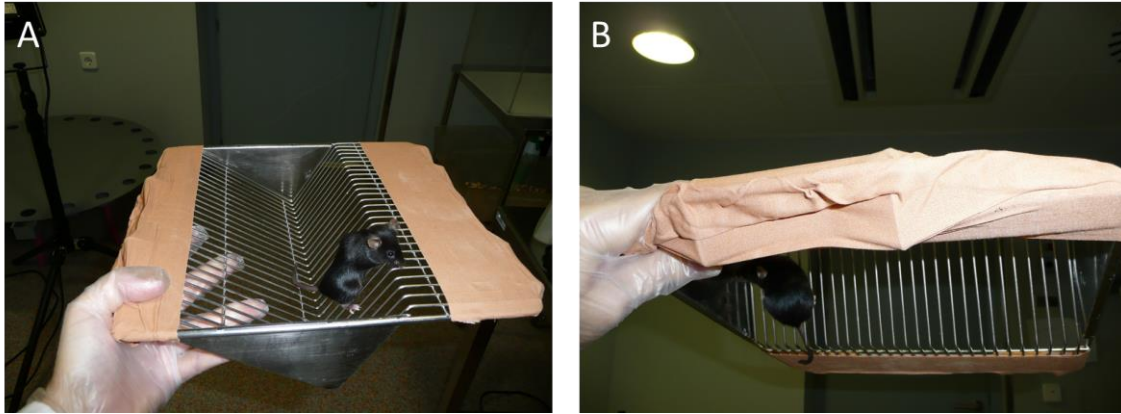


Figura 14. Test de coordinación motora “hanging wire”. Tras sacudir la rejilla suavemente para estimular al animal a agarrarse a la misma (A), se invierte (B) y se comprueba si el ratón puede permanecer al menos durante un minuto sin caer.

3.3. Pruebas de memoria

El test “*object recognition*” (Fig. 15) se emplea para evaluar la memoria no espacial, y se basa en el hecho de que los ratones exploran preferentemente los objetos nuevos frente a los que resultan familiares, si son capaces de recordar los objetos familiares. El test se realizó en una caja de metacrilato (40 cm alto x 40 cm ancho x 35 cm alto) con paredes opacas para que el animal no dispusiera de señales externas (Fig. 15). Los objetos utilizados fueron un salero, como objeto familiar, y una estructura formada con piezas de *Lego*[®], como objeto nuevo (Fig. 15). En cada prueba se emplearon varias copias idénticas de dichos objetos, para evitar posibles rastros de olor. Los objetos se colocaron en dos de las esquinas, a 5 cm de las paredes de la caja. El protocolo experimental se basó en el publicado por Leger et al., (2013), y consta dos fases:

- Fase de familiarización: el animal se colocó en el centro de la caja, conteniendo dos objetos idénticos, y se permitió la exploración de dichos objetos el tiempo necesario para alcanzar un total de 20 s de exploración. Se consideró que el ratón exploraba cuando acercaba el hocico a una distancia igual o inferior a 2 cm del objeto. A continuación se devolvió el animal a su jaula y se limpió la caja con agua jabonosa y desinfectante de superficie al 10%. Los animales que no cumplieron el criterio de exploración (20 s) al cabo de 10 min se excluyeron del análisis.

- Fase de test: A las 24 h de la fase de familiarización se evaluó la memoria a largo plazo. Para ello se colocó de nuevo al ratón en la caja, cambiando uno de los objetos familiares por un nuevo objeto. Se permitió la exploración de dichos objetos el tiempo necesario para alcanzar un total de 20 s de exploración. El proceso fue registrado mediante una cámara; mediante el análisis posterior de los vídeos (que se hizo a ciegas respecto al genotipo de los ratones) se evaluó el porcentaje de tiempo de exploración del objeto nuevo y del objeto familiar.

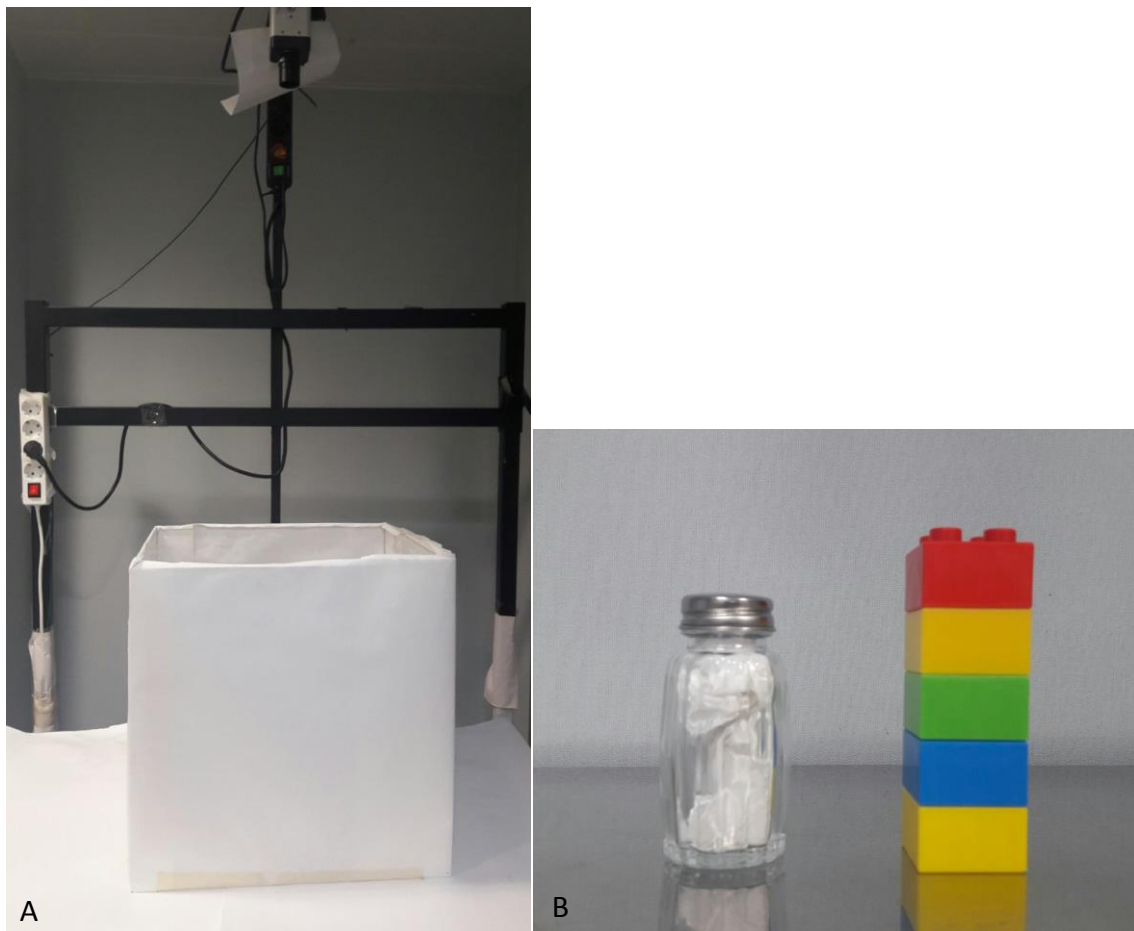


Figura 15. Test “object recognition”. (A) Sistema empleado para la evaluación de la memoria no espacial mediante el test “object recognition”. (B) Objetos empleados en dicho test.

El test “Barnes maze” (Fig. 16) se utilizó para la evaluación de la memoria espacial. Este test consiste en una plataforma circular elevada, de 92 cm de diámetro. En la periferia existen 20 orificios (5 cm de diámetro), espaciados entre ellos 7,5 cm. El animal se coloca en el centro de la plataforma y se somete a un estímulo molesto para provocar su huida hacia una pequeña cámara oscura (*target box*) situada debajo de la plataforma,

a la que se accede a través de uno de los orificios (Sunyer et al., 2007). Para facilitar la orientación espacial del ratón, se decoraron las paredes de la sala de exploración con *posters* y otras pistas visuales. Por otra parte, para provocar el comportamiento de huida se utilizó como estímulo aversivo el aire de tres ventiladores colocados alrededor de la plataforma circular (Fig. 16).



Figura 16. Test “Barnes maze”. Sistema empleado para la evaluación de la memoria espacial mediante el test “Barnes maze”. Se muestra también la disposición de las pistas visuales y los sistemas de ventiladores empleados como estímulo aversivo.

Los animales se sometieron a una fase de adaptación, conduciéndolos la primera vez hasta la *target box* y permitiendo su permanencia en la cámara de escape durante 2 min. A continuación se llevó a cabo la fase denominada “adquisición espacial”. Para ello, el animal se colocó en el centro de la plataforma y se sometió al estímulo aversivo durante 3 min, durante los que se registraron los movimientos de exploración del animal mediante una cámara de video. Si el ratón alcanza la *target box* se inactiva el estímulo aversivo y se permite que el animal permanezca durante 1 min en la cámara de escape. En caso de transcurrir 3 min sin que el ratón sea capaz de localizar la *target box*, se le conduce directamente a la misma y se le permite permanecer durante 1 min. Los animales recibieron un entrenamiento durante 4 días, consistente en 4 pruebas al día, con intervalos de 15 min entre las pruebas. La latencia primaria (tiempo necesario para alcanzar la *target box*) se utilizó para evaluar el aprendizaje de la tarea (adquisición espacial).

El quinto día, transcurridas 24 horas tras la última prueba del período de adquisición espacial, se llevó a cabo el *test* de memoria a largo plazo. En este caso se cerró el orificio de la *target box*, y se registró el comportamiento del animal durante 90 s, en presencia del estímulo aversivo.

A partir de los videos correspondientes se determinaron varios parámetros para evaluar la memoria espacial: porcentaje del tiempo de exploración en el cuadrante correcto, latencia primaria (tiempo transcurrido antes de explorar por primera vez el agujero correcto) y número de errores primarios (eventos de exploración de agujeros incorrectos antes de explorar el agujero correcto por primera vez). Para evaluar la persistencia de la memoria a largo plazo, se repitió el *test* de manera similar el duodécimo día.

3.4. Tratamiento de los ratones con rapamicina

Los ratones se trataron con rapamicina o vehículo mediante una única inyección intraperitoneal al día durante cinco días consecutivos. La rapamicina (1mg/ml) se preparó en el siguiente vehículo: NaCl al 0,9%, Polietilén-glicol 400 al 5%, Tween 80 al 5%, etanol al 4% y finalmente rapamicina a 1mg/ml (Zhou et al., 2009).

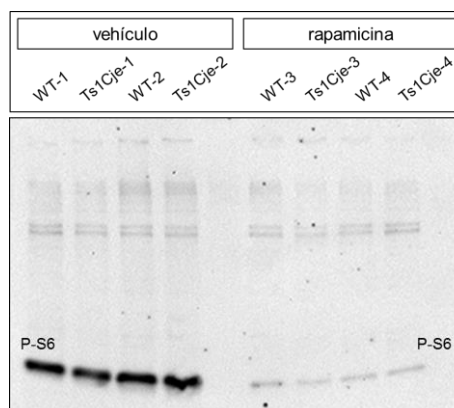


Figura 17. Control de la eficacia del tratamiento intraperitoneal con rapamicina. Ratones WT y Ts1Cje (5-7 meses de edad) se trataron con vehículo o rapamicina (10mg/kg) mediante inyección intraperitoneal cada 24 h durante 5 días consecutivos. Los ratones se sacrificaron el quinto día de tratamiento. El nivel de activación de la vía mTOR se evaluó en extractos totales de proteínas de hipocampo, mediante Western blot, utilizando un anticuerpo específico para la proteína fosfo-S6 (Ser235/236), que está bajo el control de mTOR. Se observa cómo la rapamicina reduce notablemente los niveles de fosfo-S6 tanto en los ratones WT como Ts1Cje.

3.5. Aislamiento de sinaptoneurosomas de hipocampo

Para el aislamiento de sinaptoneurosomas de hipocampo se siguió el protocolo previamente descrito por Troca-Marín et al., (2010). Los ratones (machos de 2-4 meses de edad) se sacrificaron mediante dislocación cervical e inmediatamente se decapitaron, se extrajeron los cerebros y se diseccionaron los hipocampos en PBS frío. A continuación se homogenizó el tejido con un homogenizador tipo “Dounce” de vidrio y teflón, en 12 ml de solución de homogenización consistente en: 10 mM Hepes, pH 7,4; 320 mM sacarosa; 1,0 mM MgSO₄; inhibidores de proteasa: leupeptina (10 µM), aprotinina (2 µg/ml) y pepstatina (1 µM).

El homogenado se centrifugó (1.000 g durante 10 min a 4°C), y el pellet obtenido (P1) fue sometido a un gradiente discontinuo (9-40%) de OptiPrep. Se obtuvieron 4 bandas de material (O1 a O4, Figura 18) tras la centrifugación a 16.500 g durante 30 minutos a 4°C. Se recuperó la fracción O1 y fue sometida a un gradiente discontinuo (10-25%) de Percoll. Tras la centrifugación (32.400 g durante 20 minutos a 4°C) se obtuvieron cinco bandas denominadas 1P1 a 1P5 (Figura 18). La fracción 1P4 corresponde a los sinaptoneurosomas.

3.6. Marcaje y análisis mediante iTRAQ

El marcaje y análisis mediante iTRAQ (*isobaric tags for relative and absolute quantitation*) fue llevado a cabo por el Servicio de Proteómica del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Las muestras de sinaptoneurosomas se sometieron a un tampón de lisis que contenía SDS e inhibidores de proteasas y fosfatasas. Tras su incubación (1 h) las muestras se centrifugaron durante 15 min (14.000 rpm a 4°C, en una microcentrífuga de mesa). Se recuperaron los sobrenadantes y se cuantificó la proteína total presente en las muestras. A continuación se marcaron 50 µg de cada muestra mediante iTRAQ (AB ScieX), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron marcadas por duplicado para cada condición experimental (8-plex).

Para la identificación de los péptidos se utilizó el programa Proteome Discoverer 1.4 (Thermo), fijando un FDR (False Discovery Rate) < 0.01.

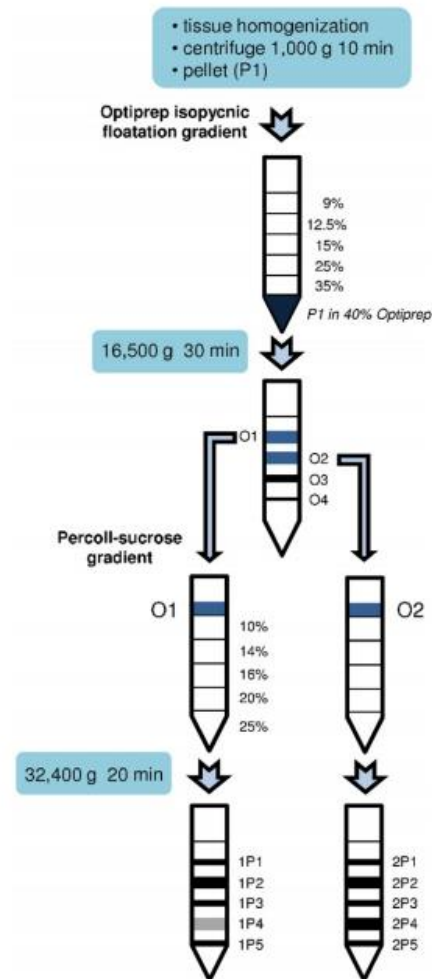


Figura 18. Aislamiento de sinaptoneurosomas. Esquema de los principales pasos del protocolo de aislamiento de sinaptoneurosomas. Tomado de Troca-Marín et al., 2010.

3.7. Análisis de ontología de genes y de vías de señalización

Se llevaron a cabo distintos *tests* de sobre-representación, utilizando la versión 11.0 del software de libre uso PANTHER (Mi, Muruganujan, & Thomas, 2013) en su versión “*on line*” (<http://www.pantherdb.org>). De este modo se comparó la lista de proteínas identificadas en las muestras de sinaptoneurosomas con el genoma completo

de *Mus musculus* (22.322 proteínas). Se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Los datos también fueron analizados utilizando el software comercial Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Summer release June 2016). Se utilizó la opción *core analysis* (análisis principal) para detectar proteínas reguladas bien al alza, bien a la baja, con un umbral restrictivo a la inclusión de al menos 1,2 veces (*cutoff* = 1,2). Este *cutoff* se determinó analizando las variaciones de los niveles de proteínas observadas en el duplicado de la muestra silvestre control (WT), y fijando los límites dentro de los cuales estuvieran incluidos más del 95% de los datos, como se recomienda (Unwin et al., 2010). En nuestro caso, el 98% de las proteínas del duplicado del WT mostraron una expresión relativa dentro del intervalo 0,83-1,2 (*cutoff* de 1,2 veces).

Como referencia para el análisis de los datos proteómicos se utilizó la base de datos “Ingenuity Knowledge Base” marcando la opción “genes only”. Además, sólo se consideraron las moléculas y/o relaciones con base experimental, demostrada en células (astrocitos o neuronas) y/o tejidos del sistema nervioso de ratón, rata o humano. El *software* IPA genera una lista de rutas canónicas significativamente afectadas, basadas en dos parámetros, denominados *p-value* y *z-score*. El *p-value*, calculado mediante el *test* exacto de Fisher de una sola cola a la derecha, es una medida de la probabilidad de que una ruta particular esté enriquecida por azar en el conjunto de proteínas desreguladas de la muestra considerada. Con objeto de aumentar la fiabilidad del análisis, sólo se consideraron las rutas con un *p-value* $\leq 0,005$ (o lo que es lo mismo, $-\log(p\text{-value}) \geq 2,3$). Además, las rutas canónicas identificadas en la muestra considerada pueden estar activadas o inhibidas de forma predictiva, según el valor del *z-score*. El algoritmo *z-score* de IPA tiene en cuenta los cambios del nivel de expresión observados en el conjunto de proteínas desreguladas. Un *z-score* positivo indica que una ruta o un regulador están predictivamente activados, y un *z-score* negativo indica por el contrario una inhibición de la ruta en cuestión. Sólo se consideraron para el análisis las rutas con un *z-score* $\geq 1,5$ ó $\leq -1,5$. Las rutas canónicas que no cumplen los requisitos para el análisis *z-score* de IPA se especifican como N/A.

3.8. Western blot cuantitativo

Las proteínas de las muestras de sinaptoneurosomas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) usando geles comerciales Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ (BioRad). Después de la electroforesis los geles fueron expuestos a radiación ultravioleta para inducir la reacción de los compuestos trihalo presentes en el gel con los residuos de triptófano de las proteínas, lo cual produce una señal fluorescente que se puede cuantificar y usar para la normalización. Tras ello las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) usando el sistema comercial recomendado para el aparato de transferencia Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad). Tras el bloqueo de la membrana y la incubación con los anticuerpos primarios adecuados (anti-FKBP1, Abcam; anti- β -actin, Sigma) la actividad de los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano fue revelada con el conjunto de sustratos WesternBright Quantum HRP Substrate (Advansta). La quimioluminiscencia resultante en la membrana fue medida usando un aparato ChemiDoc XRS System (BioRad). El comportamiento lineal de la intensidad de las señales luminiscentes obtenidas con cada anticuerpo, respecto a la cantidad de proteína presente en el carril correspondiente, se verificó realizando diluciones seriadas de las muestras de proteína.

3.9. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm SEM (desviación estándar de la media). En el *test "object recognition"*, se compararon grupos experimentales independientes de dos en dos, por lo que la significancia estadística se estableció mediante el *t-test* de Student. Para la comparación de proporciones se empleó el *test Z-Score*. En el *test "Barnes maze"*, los datos procedentes de la fase de adquisición se analizaron usando ANOVA bifactorial para medidas repetidas, con un *test post-hoc* Bonferroni. Para comparar el rendimiento en la prueba de memoria a las 24 h y a los 8 días, los datos se analizaron mediante *t-test* de Student pareado. Para determinar si los valores medios

obtenidos en los experimentos eran significativamente diferentes de un valor especificado (tiempo de ocupación del cuadrante “target” diferente del 25% o *scores* diferentes de 0) se utilizó un *t-test* de muestra única. Los niveles de significancia se indican mediante asteriscos en las figuras correspondientes: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4. RESULTADOS

4.1. El comportamiento de exploración en el *test "object recognition"* está afectado en los ratones Ts1Cje, y la rapamicina recupera dicho fenotipo

Como ya se ha mencionado, los ratones modelo de SD Ts1Cje presentan deficiencias de plasticidad sináptica (BDNF-LTP) en la región CA1 del hipocampo relacionadas con la hiperactivación de la vía mTOR (Andrade-Talavera et al., 2015). Dichas deficiencias se recuperan totalmente al pre-incubar las rodajas de cerebro con rapamicina 30 min antes de la aplicación del BDNF a las rodajas para promover la LTP. Adicionalmente a su papel en la plasticidad del hipocampo (Korte et al., 1995; Patterson y Abel, 1996), el BDNF es esencial tanto para el aprendizaje y memoria dependientes del hipocampo (Linnarsson et al., 1997; Mizuno et al., 2000) como para el mantenimiento de la LTM de tipo espacial (Bekinschtein et al., 2007).

Con objeto de identificar posibles déficits de memoria y aprendizaje en los ratones Ts1Cje y evaluar la capacidad terapéutica de la rapamicina *in vivo*, se eligieron dos *tests* de comportamiento clásicos dependientes de hipocampo, el *test "object recognition"* (memoria no espacial) y el *test "Barnes maze"* (memoria espacial).

Para llevar a cabo el *test "object recognition"* se establecieron tres grupos experimentales: ratones silvestres no tratados (WT), ratones Ts1Cje no tratados y ratones Ts1Cje tratados con rapamicina (Ts1Cje RAPA) durante los 5 días previos a la realización del *test*.

Los animales se sometieron a un sesión de familiarización, permitiéndoseles que exploraran libremente dos objetos idénticos durante un tiempo total de exploración de 20 s (criterio de inclusión, véase Materiales y Métodos). En esta fase no se observó ninguna preferencia por la exploración de uno de los dos objetos en particular, de modo que, en los tres grupos experimentales, los animales exploraron cada objeto durante aproximadamente 10 s (resultados no mostrados). Sin embargo, los ratones Ts1Cje tardaron significativamente más tiempo en alcanzar el criterio (307 ± 29 s; $n=13$) que los ratones Ts1Cje RAPA (222 ± 21 s; $n=8$; $p=0,05$; *t-test*), que a su vez mostraron un comportamiento exploratorio similar a los ratones WT (238 ± 9 s; $n=10$).

En la fase de prueba, llevada a cabo 24 h más tarde, uno de los objetos familiares se reemplazó por un nuevo objeto, y se repitió el experimento. Cuando sólo se consideraron en el análisis los animales que alcanzaron el criterio de inclusión (según lo recomendado por Leger et al., 2013), no se observó diferencia alguna en la LTM entre los distintos grupos experimentales (Tabla 4), y todos los ratones mostraron preferencia de exploración del nuevo objeto, sugiriendo que eran capaces de recordar el objeto familiar. Sin embargo, de forma muy llamativa, se observó que el 45% de los ratones Ts1Cje fue incapaz de alcanzar el criterio (Tabla 4), lo que sugería una exacerbación del déficit de comportamiento exploratorio que mostraron en la fase de familiarización. De modo interesante, esa falta de comportamiento exploratorio no se manifestó en los ratones Ts1Cje RAPA (Tabla 4), sugiriendo que la rapamicina contrarresta dicha anomalía.

	WT	Ts1Cje	Ts1Cje RAPA
Ratones que no alcanzaron el criterio (n)	1	9	1
Ratones que alcanzaron el criterio (n)	18	11	14
Número total de ratones estudiados (n)	19	20	15
Tiempo medio (s) en alcanzar el criterio \pm SEM	293,67 \pm 29,38	298,09 \pm 40,11	266,50 \pm 34,29
Índice exploratorio medio (%) \pm SEM	60,73 \pm 3,87	59,72 \pm 2,90	57,68 \pm 5,08

Tabla 4. Resultados obtenidos en el test “object recognition”. No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos respecto al tiempo medio empleado para alcanzar el criterio o el índice exploratorio medio (t-test). Sin embargo, la proporción de ratones que no alcanzó el criterio fue significativamente más alta en el caso de los ratones Ts1Cje (WT vs Ts1Cje, Z-Score = -2,8407, p = 0,00452; WT vs Ts1Cje RAPA, Z-Score = -0,1727, p = 0,86502; Ts1Cje vs Ts1Cje RAPA, Z-Score = 2,4843, p = 0,01314).

4.2. La persistencia de la memoria espacial a largo plazo está afectada en los ratones Ts1Cje, y este déficit es revertido por la rapamicina.

Trabajos previos de otros laboratorios han demostrado que los ratones Ts1Cje presentan una capacidad disminuida en el test “Morris water maze” (Sago et al., 1998), que se emplea para evaluar la memoria espacial dependiente de hipocampo (véase Introducción). Sin embargo, se ha comprobado que la aplicación de un estímulo aversivo

de alta intensidad, como puede ser el agua en el *test* “*Morris water maze*”, puede afectar al rendimiento de los animales (Hölscher, 1999). Por este motivo, se decidió emplear el *test* “*Barnes maze*”, basado en un aprendizaje espacial similar al de “*Morris water maze*”, pero que genera menos estrés en los animales (Sunyer et al., 2007). En esta prueba, el ratón se coloca en una plataforma seca circular y se expone a un estímulo aversivo débil, en este caso un chorro de aire generado por tres ventiladores equidistantes entre ellos y colocados radialmente respecto al centro, para inducir la huida del animal hacia el orificio de escape (*target box*).

Se establecieron cuatro grupos experimentales: ratones silvestres (WT) y trisómicos (Ts1Cje) sin tratar, y ratones Ts1Cje tratados con vehículo (Ts1Cje vehicle) o con rapamicina (Ts1Cje RAPA) durante los 5 primeros días previos a la fase de entrenamiento, siguiendo el protocolo descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Los ratones fueron entrenados durante 4 días consecutivos, a razón de 4 sesiones por día con un intervalo de 15 minutos entre sesiones. Posteriormente, a las 24 h, se evaluó la LTM, y 8 días más tarde, la persistencia de la LTM (Fig. 19).

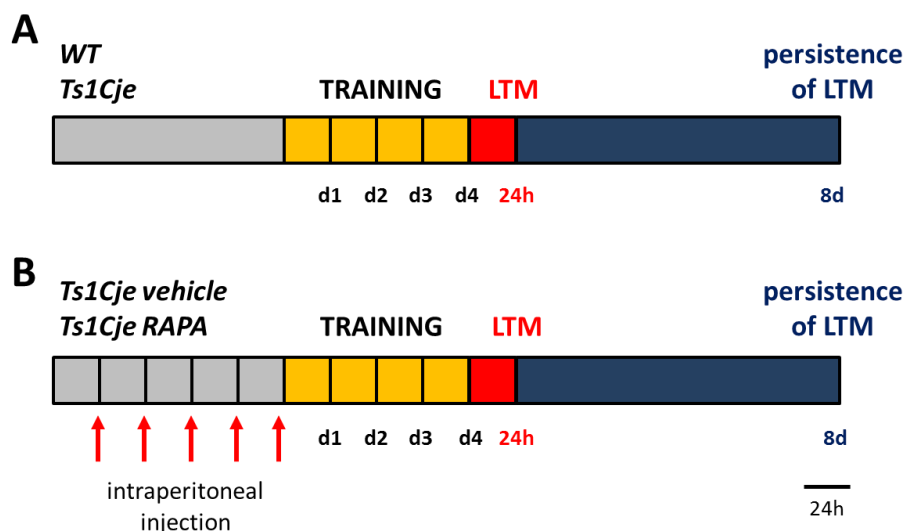


Figura 19. Esquema temporal del protocolo seguido en el *test* “*Barnes maze*”. Ratones WT y Ts1Cje sin tratar (A) o tratados con vehículo o rapamicina (10 mg/kg) mediante inyección intraperitoneal cada 24 h durante 5 días consecutivos (B) se sometieron a entrenamiento (TRAINING) durante 4 días consecutivos. Transcurridas 24 h se evaluó la LTM, y 8 días más tarde la persistencia de la LTM.

Respecto a la fase de entrenamiento, en todos los grupos experimentales se observó una disminución significativa de la latencia primaria (es decir, del tiempo empleado en alcanzar la *target box*) respecto al tiempo, demostrando que la capacidad de adquisición de la memoria espacial en esta tarea estaba intacta en todos los grupos experimentales (Fig. 20).

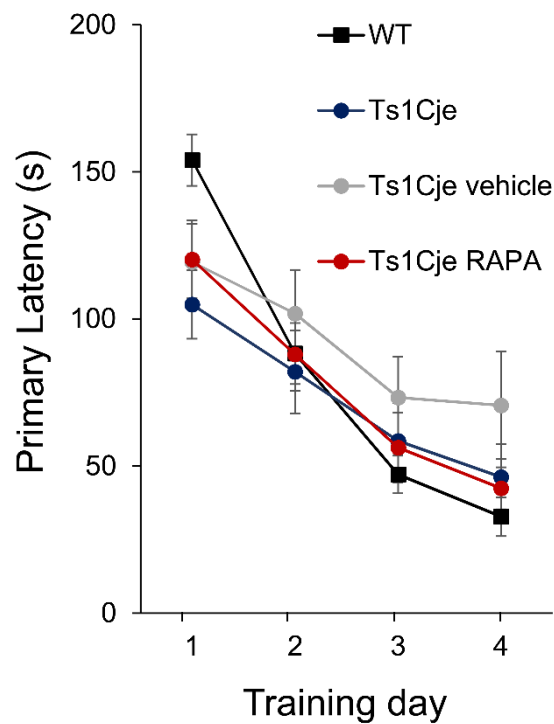


Figura 20. Análisis del aprendizaje espacial de ratones WT y Ts1Cje no tratados, y ratones Ts1Cje tratados con vehículo (Ts1Cje vehicle) o rapamicina (Ts1Cje RAPA) evaluado por día de entrenamiento. Se representa la latencia primaria (en s) para alcanzar la *target box* durante los días de entrenamiento 1 a 4. Los datos se muestran como valores medios \pm SEM de los valores medios obtenidos para cada bloque de 4 pruebas diarias. El análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de dos factores con medidas repetidas, aplicando *tests post-hoc* de Bonferroni, resultó en valores $p > 0,05$ para la comparación de todos los grupos experimentales, excepto para la comparación entre ratones WT y Ts1Cje en el día 1 ($p < 0,05$). Sin embargo, el mismo análisis realizado para comparar las pruebas no agrupadas por día (es decir, pruebas de 1 a 16), no reveló diferencias significativas entre los grupos experimentales. Se observó un descenso significativo de la latencia primaria respecto al tiempo en todos los grupos ($p < 0,0001$).

Por otra parte, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos, en los ratones Ts1Cje tratados con vehículo se observaron valores medios más altos de latencia primaria que en los ratones Ts1Cje sin tratar (Fig. 20). Además al representar gráficamente los valores de latencia primaria de las 16 pruebas llevadas a cabo durante

la fase de entrenamiento, se observó una cinética alterada en el proceso de aprendizaje de los ratones Ts1Cje tratados con vehículo (Fig. 21). Estos datos sugieren que el proceso de aprendizaje podría estar ligeramente alterado en estos ratones.

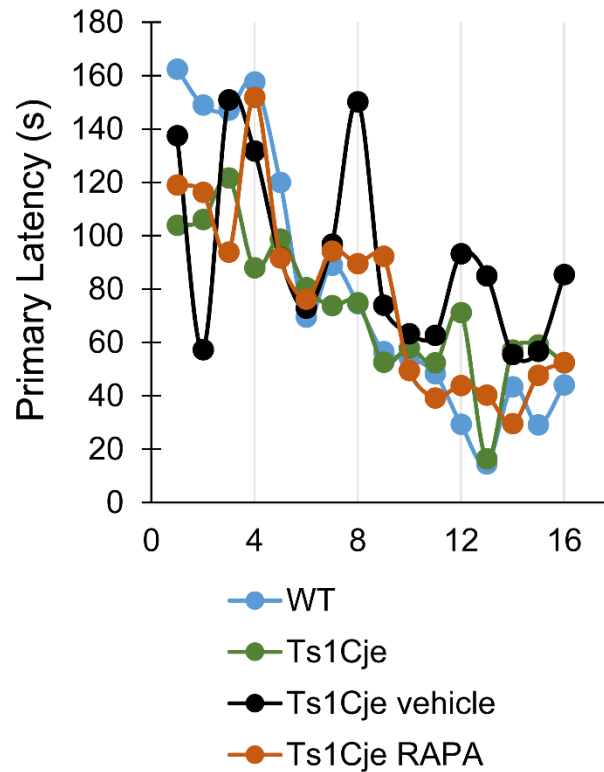


Figura 21. Análisis del aprendizaje espacial de ratones WT y Ts1Cje no tratados, y ratones Ts1Cje tratados con vehículo (Ts1Cje vehicle) o rapamicina (Ts1Cje RAPA) evaluado por prueba durante la fase de entrenamiento. Se representa la latencia primaria (en s) para alcanzar la target box en cada una de las 16 pruebas realizadas durante la fase de entrenamiento. Cuando el animal fue incapaz de encontrar la target box durante el tiempo de prueba, se asumió el valor máximo (es decir, 180 s). Nótese la cinética alterada del proceso de aprendizaje en los ratones Ts1Cje tratados con vehículo, en los que se alcanzaron picos de latencia primaria (evidenciando un menor rendimiento) en la última prueba de cada bloque de pruebas diario.

Tras el período de entrenamiento (fase de aprendizaje), se evaluó la consolidación de la memoria a largo plazo (24 h más tarde) y la persistencia de la LTM (8 días después) (Sunyer et al., al 2007). A 24 horas, el comportamiento fue similar entre los grupos WT, Ts1Cje y Ts1Cje RAPA, y el tiempo medio de ocupación del cuadrante en el que se localizaba la *target box* virtual (cuadrante “*target*”) fue mayor que lo esperado por azar (es decir, superior al 25 %) en los tres grupos, lo que demuestra que la LTM no se encontraba afectada (Fig. 22). Sin embargo, en el grupo de ratones Ts1Cje tratados con

vehículo se observó un rendimiento inferior, pues el tiempo medio de ocupación del cuadrante “target” no fue estadísticamente diferente del 25 %. Estos datos sugieren que la composición del vehículo y/o el manejo de los animales anterior a la fase de entrenamiento tuvieron un impacto negativo en la consolidación de la memoria de los ratones trisómicos.

Por otra parte, la prueba de persistencia de la LTM a los 8 días mostró que tanto los ratones Ts1Cje sin tratar como los tratados con vehículo permanecían en el cuadrante “target” durante un tiempo no significativamente superior al 25%. Sin embargo, los ratones Ts1Cje tratados con rapamicina mostraron tiempos de ocupación del cuadrante “target” similares al grupo WT y por encima del 25% (Fig. 22).

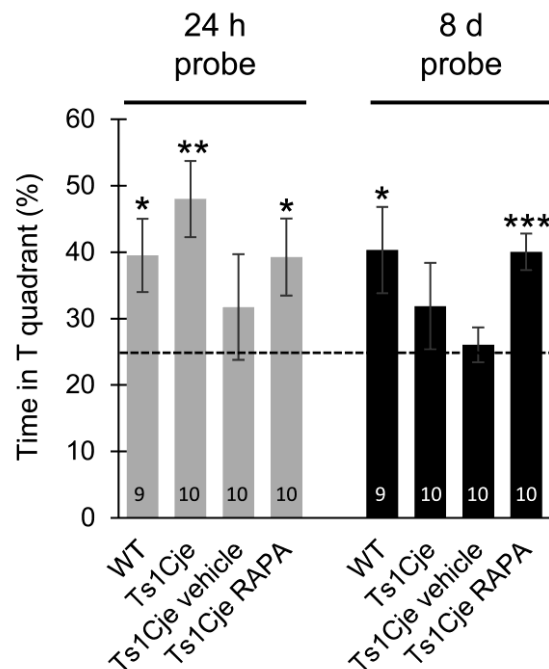


Figura 22. Análisis de la consolidación y la persistencia de la memoria espacial de ratones WT y Ts1Cje no tratados, y ratones Ts1Cje tratados con vehículo (Ts1Cje vehicle) o rapamicina (Ts1Cje RAPA). Se representa el tiempo medio de ocupación (en %) del cuadrante “target” (en el que se localiza la *target box* virtual) en cada grupo experimental, a las 24 h y a los 8 días de la fase de entrenamiento. Las barras de error indican la SEM. La línea punteada indica el nivel de ocupación esperado por azar (25%). A las 24 h, el análisis estadístico mediante *t-test* de una muestra para la media diferente al 25% mostró valores de *p* significativos en todos los casos, excepto para el grupo de ratones Ts1Cje tratados con vehículo ($p = 0,030$ para WT, $n = 9$; $p = 0,003$ para Ts1Cje, $n = 10$; $p = 0,419$ para Ts1Cje vehicle, $n = 10$; $p = 0,036$ para Ts1Cje RAPA, $n = 10$). A los 8 días, el análisis estadístico mediante *t-test* de muestra única para la media diferente al 25% mostró valores de *p* no significativos sólo en el caso de los ratones Ts1Cje no tratados y tratados con vehículo ($p = 0,046$ para WT, $n = 9$; $p = 0,318$ para Ts1Cje, $n = 10$; $p = 0,698$ para Ts1Cje vehicle, $n = 10$; $p = 0,0004$ para Ts1Cje RAPA, $n = 10$).

Estos resultados sugieren que la rapamicina tiene un efecto positivo sobre la persistencia de la LTM en los ratones Ts1Cje. Al comparar de manera individual el tiempo que pasaba cada ratón en el cuadrante “*target*” en la prueba de memoria a las 24 h y a los 8 días, los resultados mostraron un claro empeoramiento del rendimiento en el caso de los ratones Ts1Cje sin tratar, mientras que los ratones Ts1Cje RAPA mostraron un rendimiento similar al WT (Fig. 23A). Así, la determinación del *score* “tiempo en el cuadrante *target*”, definido como la media de los valores de las diferencias entre el porcentaje del tiempo en el cuadrante *target* a los 8 días y las 24h para cada ratón individual, mostró un valor negativo para los ratones Ts1Cje sin tratar. En cambio, para los grupos WT y Ts1Cje RAPA mostró valores cercanos a cero (Fig. 23B).

El análisis de otros parámetros como la latencia primaria (Fig. 23C, D) y el número de errores primarios (Fig. 23E, F) confirmaron el empeoramiento en la ejecución de la tarea a lo largo del tiempo en los ratones Ts1Cje, y el efecto positivo de la rapamicina.

Respecto a los ratones Ts1Cje tratados con vehículo, su rendimiento fue similar en las pruebas realizadas a las 24 h y a los 8 días, resultando en *scores* no significativamente distintos de 0 (*t-test* para muestra única: $p = 0,503$, $n=10$ para el *score* “tiempo en el cuadrante *target*”; $p = 0,735$, $n=10$ para el *score* “latencia primaria”; $p = 0,755$, $n=9$ para el *score* “errores primarios score”; datos no mostrados).

Finalmente, a modo de control, se comprobó el efecto del tratamiento con rapamicina sobre ratones WT (WT RAPA), no observándose grandes diferencias en el rendimiento de estos ratones con respecto a los ratones WT sin tratar (Tabla 5).

En su conjunto, los datos obtenidos mediante el *test* “*Barnes maze*” demuestran que, aunque los ratones Ts1Cje presentan un aprendizaje y una consolidación de la memoria (LTM medida a las 24h) normales, muestran un defecto en la persistencia de la LTM, siendo este fenotipo completamente restaurado por la rapamicina.

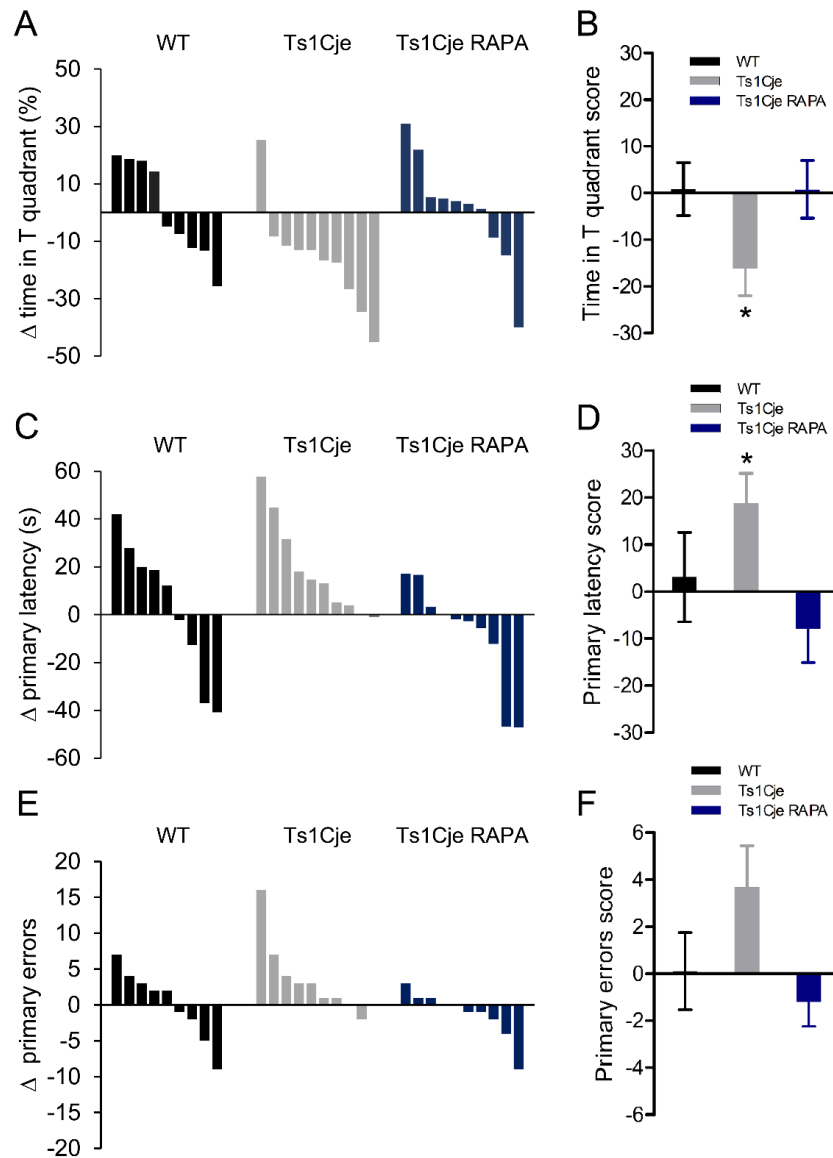


Figura 23. Diferencias en la ocupación del cuadrante *target*, latencia primaria y número de errores primarios en la prueba de memoria a 8 días versus 24 h para cada ratón individual. (A) Diferencia de ocupación del cuadrante *target* para cada animal, expresado en % de tiempo. (B) *Score* “tiempo en el cuadrante *target*” (media de los valores mostrados en el panel A para cada grupo experimental); se observó un *score* negativo, significativamente distinto de 0, en los ratones Ts1Cje no tratados (t-test de muestra única: $p = 0,888$ para WT, $n = 9$; $p = 0,023$ para Ts1Cje, $n = 10$; $p = 0,903$ para Ts1Cje RAPA, $n = 10$). (C) Diferencia en latencia primaria para cada animal, expresado en segundos. (D) *Score* “latencia primaria” (media de los valores mostrados en el panel C para cada grupo experimental); se observó un *score* positivo, significativamente distinto de 0, en los ratones Ts1Cje no tratados, indicando que los animales de este grupo tardaron más tiempo en alcanzar la *target box* virtual a los 8 días que a las 24 h; (t-test de muestra única: $p = 0,756$ para WT, $n=9$; $p = 0,015$ para Ts1Cje, $n = 10$; $p = 0,292$ para Ts1Cje RAPA, $n = 10$). Se consideró el valor máximo de latencia primaria (es decir, 90 s) en el caso de un ratón Ts1Cje no tratado que fue incapaz de alcanzar la *target box* virtual en ambas pruebas. (E) Diferencia en el número de errores primarios para cada animal. (F) *Score* “errores primarios” (media de los valores mostrados en el panel E para cada grupo experimental); se observó un *score* positivo en el caso de los ratones Ts1Cje no tratados; (t-test de muestra única: $p = 0,948$ para WT, $n=9$; $p = 0,071$ para Ts1Cje, $n=9$; $p = 0,283$ para Ts1Cje RAPA, $n=10$). El ratón Ts1Cje que no fue capaz de encontrar la *target box* virtual se excluyó de este análisis.

Parámetro Barnes maze	Grupo	Prueba 24 h media ± SEM	Prueba 8 días media ± SEM	n
Tiempo en el cuadrante <i>target</i> (%)	WT ¹	39,5 ± 5,5	40,3 ± 6,5	9
	WT RAPA	32,8 ± 6,0 ²	39,6 ± 3,7	10
Latencia primaria (s)	WT ¹	22,8 ± 5,5	25,9 ± 6,0	9
	WT RAPA	28,1 ± 10,5	17,4 ± 3,0	10 ³
Número de errores primarios	WT ¹	4,1 ± 1,3	4,2 ± 1,3	9
	WT RAPA	3,4 ± 1,1	3,4 ± 0,8	8 ⁴

Tabla 5. Efecto de la rapamicina en la memoria espacial de ratones WT. Se muestran los valores obtenidos en distintos parámetros medidos en el *test "Barnes maze"* en ratones WT y WT RAPA a las 24 h (LTM) y a los 8 días (persistencia de la LTM); se indica el número de ratones (n) analizados en cada caso.

¹El grupo WT es el mismo que el de las Figuras 22 y 23.

²Este porcentaje no es significativamente diferente del 25% ($p = 0,227$, t-test de muestra única).

³Se consideraron valores máximos de latencia primaria (es decir, 90 s) en el caso de dos animales que no fueron capaces de encontrar la *target box* virtual en la prueba de 24 h.

⁴Los animales que no encontraron la *target box* virtual se excluyeron de este análisis.

4.3. Caracterización proteómica de sinaptoneurosomas de hipocampo de ratones WT y Ts1Cje, tratados o no con rapamicina.

Los resultados obtenidos mediante *tests* de memoria y aprendizaje demostraron un efecto positivo de la rapamicina sobre el comportamiento exploratorio y la persistencia de la LTM en los ratones Ts1Cje. Además, la rapamicina recupera completamente la BDNF-LTP en rodajas de hipocampo de estos ratones (Andrade-Talavera et al., 2015). Por otra parte, la rapamicina parecía no influir ni positiva ni

negativamente sobre el rendimiento de los ratones WT en las pruebas comportamentales, a pesar de que, aplicado en rodajas de hipocampo, abole completamente la BDNF-LTP (Tang et al., 2002; Andrade-Talavera et al., 2015).

Con objeto de identificar los cambios proteómicos a nivel sináptico que pudiesen mediar los diferentes efectos de la rapamicina en ratones WT y Ts1Cje, tanto a nivel de plasticidad sináptica como de memoria y aprendizaje, se llevó a cabo un análisis proteómico mediante iTRAQ de sinaptoneurosomas (SNs) de hipocampo.

Para ello se establecieron cuatro grupos experimentales: ratones WT sin tratar o tratados con rapamicina (WT RAPA), y ratones Ts1Cje sin tratar o tratados con rapamicina (Ts1Cje RAPA). En el caso de los ratones tratados, se realizó una inyección intraperitoneal diaria de rapamicina (10 mg/kg) durante 5 días consecutivos, y tras cinco días, con objeto de seguir un protocolo similar al utilizado en el *test* de Barnes maze, se procedió al aislamiento de los SNs.

Se realizaron duplicados técnicos de cada muestra, que se marcaron separadamente y se sometieron a iTRAQ 8-plex (Servicio de Proteómica del Instituto de Biomedicina de Sevilla).

De este modo se identificaron 3.059 proteínas, considerando la presencia de al menos dos péptidos únicos (Tabla S1, Archivo Suplementario 1). De éstas, 2.565 proteínas correspondieron a proteínas mapeadas (IDs) in la base de datos PANTHER *gene ontology*. Con objeto de verificar la composición molecular de las fracciones sinaptoneurosomales obtenidas con el protocolo previamente puesto a punto en el laboratorio (Troca-Marín et al., 2010), se llevaron a cabo diferentes *tests* de sobre-representación usando PANTHER para clasificar las proteínas identificadas atendiendo a distintos criterios: función molecular, clase de proteína, componente celular al que pertenecen, rutas y procesos biológicos en los que intervienen.

Como sería esperable para una fracción enriquecida en SNs de hipocampo, las proteínas de vesículas sinápticas, densidad post-sináptica y los receptores de glutamato estaban significativamente representados en las muestras (Archivo Suplementario 2). De forma interesante, estas fracciones también estaban muy enriquecidas en proteínas implicadas en traducción, incluyendo ribosomas, aminoacil-tRNA-sintetasas,

chaperonas, y factores de iniciación y elongación de la traducción, sugiriendo la importancia de la traducción local en el hipocampo.

Con objeto de comparar los niveles de cada proteína detectada en las diferentes muestras, se referenciaron sus valores a uno de los replicados del grupo experimental WT sin tratamiento. A continuación, para cada par de replicados técnicos se eliminaron los datos cuyo coeficiente de variación (CV) fue superior al 30% (58 proteínas en total), y se calculó la media geométrica (más adecuada que la media aritmética, al tratarse de proporciones) de los valores de expresión para cada replicado. Estos valores se utilizaron para el análisis subsiguiente utilizando el programa informático Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Tabla S2, Archivo Suplementario 1). De 3.001 proteínas inicialmente incluidas en IPA, 15 resultaron no estar mapeadas, y de las 2.986 identidades mapeadas, 2.950 se identificaron como “listas para su análisis por IPA”.

Considerando un *cutoff* de 1.2 veces (véase Materiales y Métodos), sólo 49 proteínas estaban desreguladas en los SNs Ts1Cje, comparando con los SNs WT (Tabla S3, Archivo Suplementario 1). Sin embargo, 358 proteínas estaban afectadas en los SNs de ratones WT tratados con rapamicina (WT RAPA SNs), y 597 en los SNs de ratones Ts1Cje tratados con rapamicina (Ts1Cje RAPA SNs) (Tablas S4 y S5, Archivo Suplementario 1). El número de proteínas afectadas al alza y a la baja se muestra en la Tabla 6.

Muestras	Proteínas expresadas a mayor nivel	Proteínas expresadas a menor nivel	Proteínas afectadas
SNs Ts1Cje	23	26	49
SNs WT RAPA	227	131	358
SNs Ts1Cje RAPA	338	241	597

Tabla 6. Cambios proteómicos en SNs de hipocampo de ratones Ts1Cje, WT RAPA y Ts1Cje RAPA . Se muestra el número de proteínas expresadas en cada muestra a mayor o menor nivel, comparando con SNs de ratones WT sin tratar, así como la suma de ambas (número total de proteínas afectadas).

El análisis IPA reveló que, atendiendo al parámetro *p-value* de Fisher, la ruta canónica de disfunción mitocondrial aparecía enriquecida en el conjunto de proteínas desreguladas en Ts1Cje SNs (*p-value* 2,34E-03), aunque sólo 4 de las 138 proteínas que constituyen esta ruta estaban afectadas. Respecto a las muestras SNs WT RAPA y SNs Ts1Cje RAPA, las listas de las rutas canónicas previsiblemente afectadas se recogen en las Tablas S6 y S7, respectivamente (Archivo Suplementario 3). La ruta de disfunción mitocondrial y la ruta de fosforilación oxidativa (que solapan parcialmente) aparecen en ambas muestra entre las representadas de manera más significativa (Fig. 24 y Archivo Suplementario 3).

Además, y en consonancia con el hecho de que la rapamicina sea un inhibidor específico de la quinasa mTOR, la vía mTOR y las rutas parcialmente solapantes con ésta (EIF2, eIF4E y p70S6K) también aparecían significativamente representadas en los conjuntos de proteínas alteradas (Figura 24 y Archivo Suplementario 3). Considerando el importante papel de dichas rutas en plasticidad sináptica, no es sorprendente que las rutas involucradas en LTP y señalización por CREB (cAMP response element-binding) también fueran identificadas con *p-values* de Fisher significativos (Archivo Suplementario 3).

En el caso concreto de las muestras SNs WT RAPA, también aparecían significativamente representados el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y algunas rutas de beta-oxidación de ácidos grasos y de degradación de aminoácidos (Figura 24 y Archivo Suplementario 3).

Teniendo en cuenta el análisis IPA en cuanto al parámetro *Z score*, que predice las rutas activadas o inhibidas, según los niveles de expresión de las proteínas que las constituyen, se observaron diferencias notables e interesantes entre las muestras WT RAPA y Ts1Cje RAPA (Tablas S6 y S7 en el Archivo Suplementario 3, y Fig. 25). Estas diferencias sugerían que la rapamicina tenía efectos opuestos en las rutas relacionadas con plasticidad sináptica en los ratones WT y Ts1Cje. Así, mientras que las vías de señalización de LTP, ERK/MAPK, proteína quinasa A, y señalización por calcio estaban predictiblemente inhibidas en SNs de ratones WT tratados con rapamicina, esas rutas se

encontraban normalizadas o ligeramente activadas en SNs de ratones Ts1Cje tratados con rapamicina. Al contrario, las vías de señalización eIF4E y p70S6K estaban predictiblemente activadas en las muestras SNs WT RAPA, pero normalizadas en Ts1Cje RAPA SNs (Fig. 25).

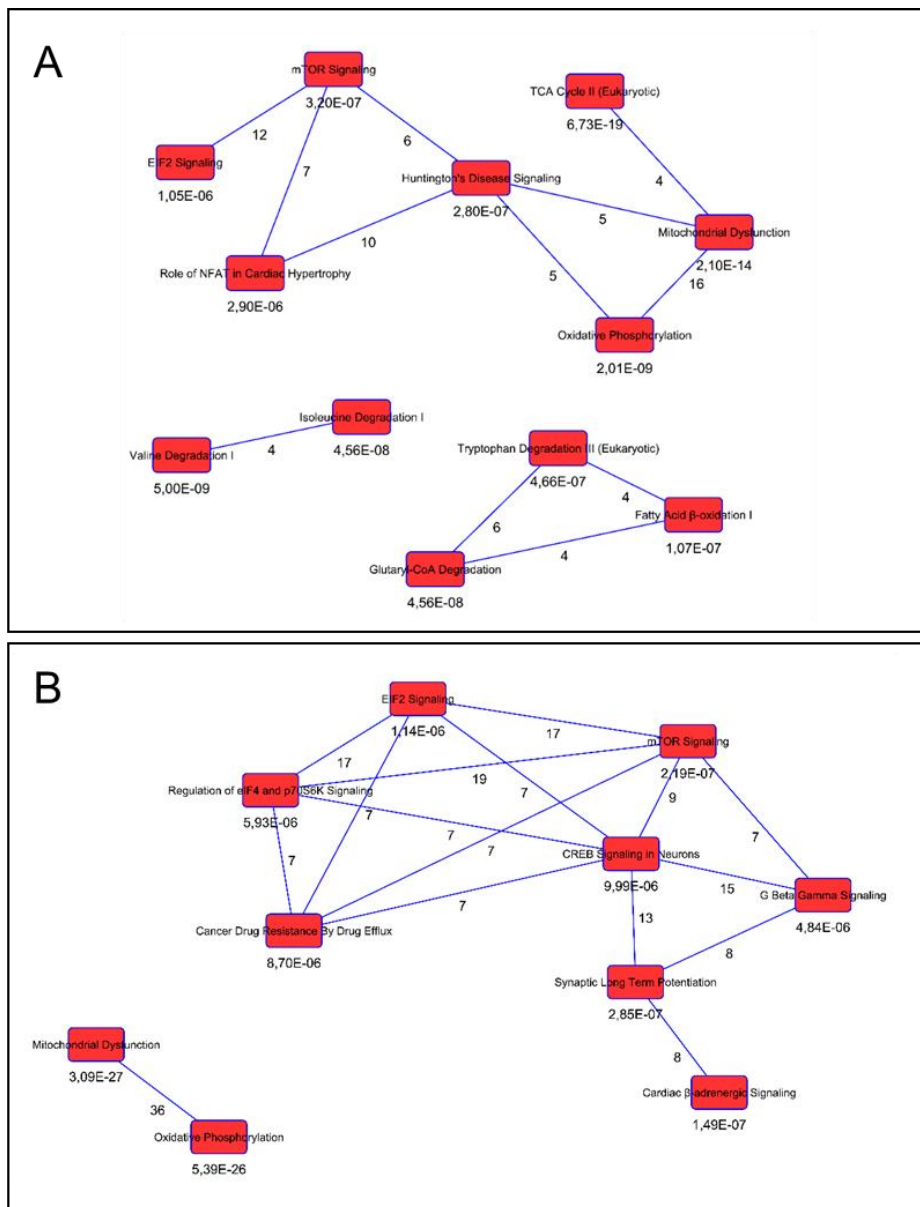


Figura 24. Rutas canónicas identificadas mediante IPA entre los conjuntos de proteínas desreguladas en SNs de ratones WT RAPA (A) y Ts1Cje RAPA (B). Se muestran las rutas más significativas, indicándose el *p-value* de Fisher debajo de la ruta correspondiente. También se indica (en las líneas que conectan distintas rutas) el número de proteínas alteradas en común entre dichas rutas, que son parcialmente solapantes. Por razones de claridad, sólo los pares de rutas que comparten al menos 4 proteínas (en el caso SNs WT RAPA) o 7 proteínas (en el caso SNs Ts1Cje RAPA) se han conectado entre sí en la figura.

Un análisis en mayor profundidad de la vía mTOR (Fig. 26 y Archivo Suplementario 4), reveló que los niveles de la proteína FKBP1 (FK506-binding protein 1a, también conocida como FKBP12) se encontraban reducidos en Ts1Cje RAPA SNs, pero no en WT RAPA SNs. Las proteínas FKBP1 constituyen la diana molecular de la rapamicina, ya que es el complejo FKBP1-rapamicina el que interacciona con la quinasa mTOR, inhibiéndola. Trabajos anteriores han demostrado que las proteínas FKBP1 son factores limitantes, y como consecuencia, críticos para la respuesta a rapamicina (Schreiber et al., 2015). Por tanto, este hecho sugiere una base molecular para explicar por qué los ratones Ts1Cje tratados con rapamicina no experimentan los efectos negativos que este fármaco tiene sobre la plasticidad sináptica en los animales WT (Andrade-Talavera et al., 2015).

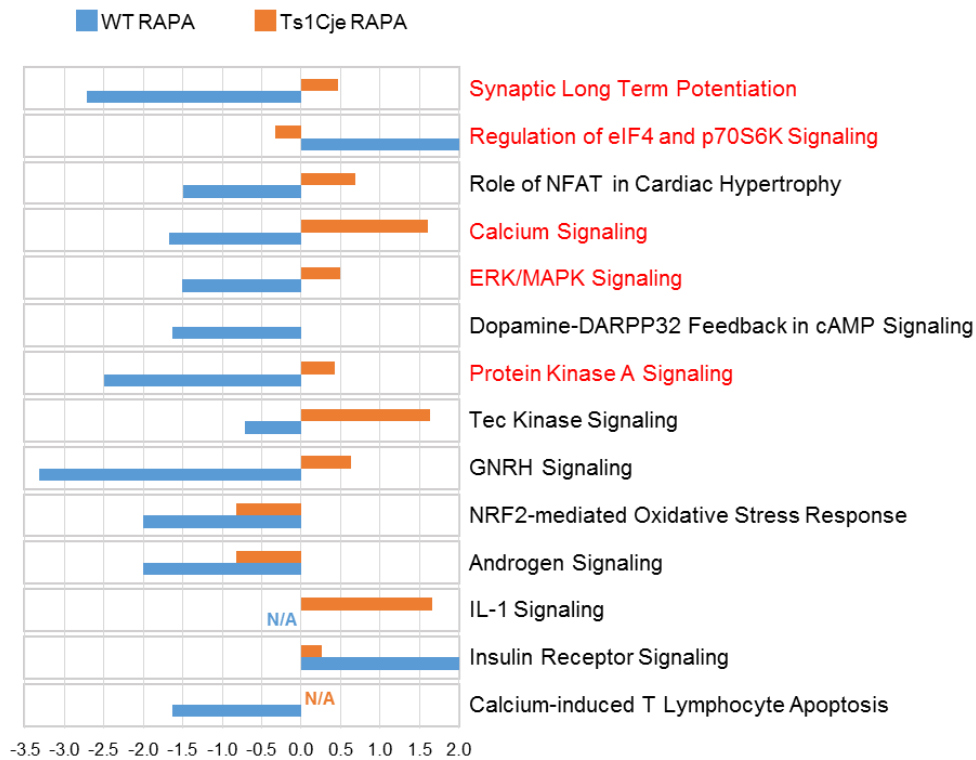


Figura 25. Análisis Z score de las rutas canónicas identificadas mediante IPA entre los conjuntos de proteínas desreguladas en SNs de ratones WT RAPA (A) y Ts1Cje RAPA (B). Se muestran las rutas que presentaron un p -value $< 0,005$ y un Z score $> 1,5$ ó $< -1,5$. Las rutas mostradas están ordenadas por su valor p -value (arriba las que tienen un p -value menor). Nótese que un importante número de rutas canónicas identificadas por IPA con un valor bajo p -value no son elegibles para el análisis de actividad (Z score) (véase Archivo Suplementario 3).

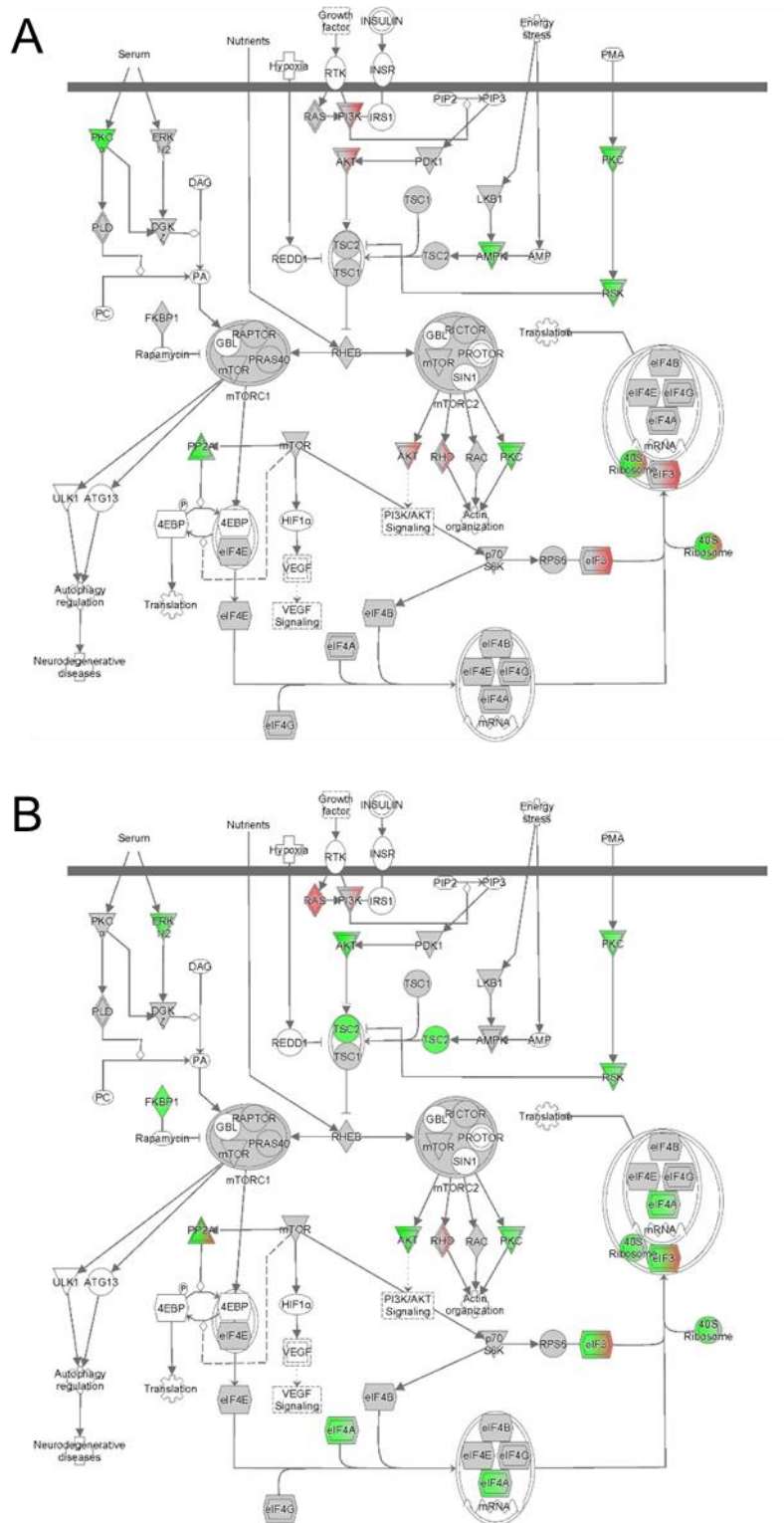


Figura 26. Análisis de la vía mTOR mediante IPA en SNs de ratones WT RAPA (A) y Ts1Cje RAPA (B). Se muestran en verde las proteínas o complejos proteicos con niveles de expresión reducidos, y en rojo con valores incrementados (respecto a SNs WT de ratones sin tratar). En gris se indican las proteínas sin cambios, y en blanco las proteínas no detectadas en el análisis proteómico. Algunos complejos proteicos presentan más de un color, según los niveles de expresión de las subunidades que los forman.

Con objeto de verificar este importante aspecto se llevó a cabo la cuantificación de los niveles de FKBP1 mediante Western blot cuantitativo. Para ello se prepararon nuevas fracciones de SNs a partir de animales WT y Ts1Cje tratados o no con rapamicina, de manera similar al experimento que se realizó para la obtención de las muestras que fueron analizadas mediante iTRAQ.

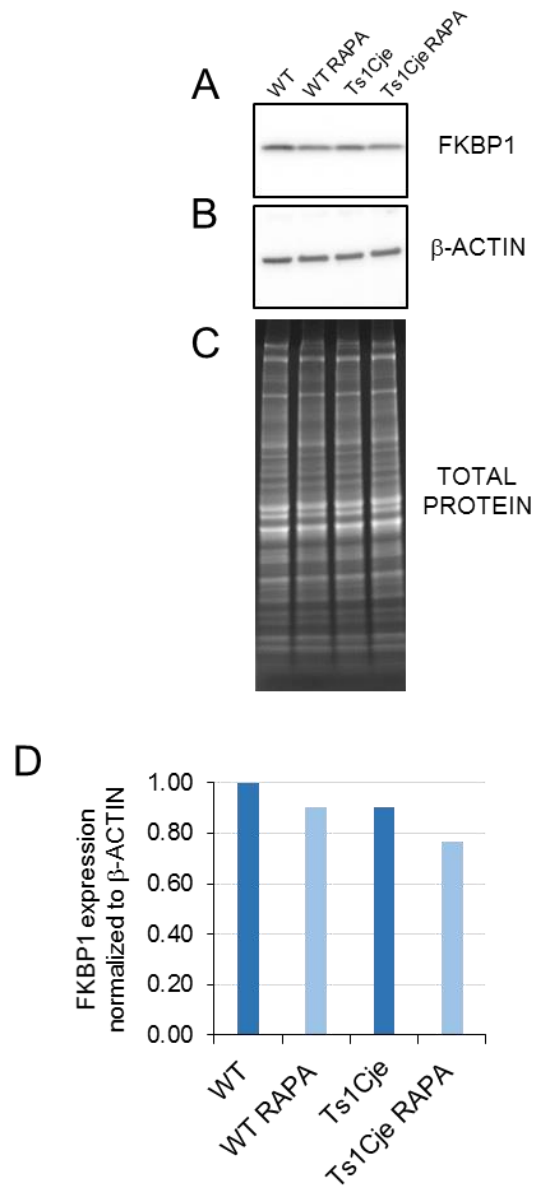


Figura 27. Detección mediante Western blot de los niveles de FKBP1 en SNs de hipocampo de ratones WT y Ts1Cje tratados o no con rapamicina. Se muestra la imagen obtenida para la inmunodetección de la proteína FKBP1 (A) y β -ACTIN (B), utilizada esta última como normalizador tras comprobarse que la señal obtenida era proporcional a la cantidad de proteína total presente en el gel (C). También se muestra la cuantificación de la señal FKBP1 normalizada (D), en unidades arbitrarias.

Los resultados preliminares obtenidos con esta técnica (Fig. 27) permitieron confirmar los correspondientes al análisis proteómico, observándose unos niveles más reducidos de FKBP1 en SNs procedentes de ratones tratados con rapamicina Ts1Cje (Ts1Cje RAPA) que WT (WT RAPA). No obstante, al tratarse de un único experimento, estos resultados deben considerarse preliminares y verificarse, además, mediante técnicas complementarias.

5. DISCUSIÓN

5.1. Efecto terapéutico de la rapamicina sobre el comportamiento exploratorio y la persistencia de la LTM en los ratones Ts1Cje

En este trabajo se ha caracterizado el comportamiento del ratón Ts1Cje en dos *tests* clásicos de aprendizaje y/o memoria dependientes de hipocampo: “*object recognition*” y “*Barnes maze*”.

Los resultados obtenidos en el *test* “*object recognition*” mostraron un comportamiento exploratorio reducido en los ratones Ts1Cje, tanto en la fase de familiarización como en la fase de prueba, lo que estaría en consonancia con las observaciones realizadas por Sago et al. (1998) en su descripción original de este modelo de SD. En dicho trabajo, estos autores reportan una menor actividad locomotora en el centro de la caja en el *test* “*open field*”, parámetro que se toma como medida del comportamiento exploratorio.

Por otra parte, los déficits de comportamiento exploratorio observados en esta Tesis Doctoral en el *test* “*object recognition*” fueron más acentuados en la fase de prueba que en la fase previa, sugiriendo una pérdida progresiva de motivación exploradora al resultar familiar el entorno. En relación con esta observación, un trabajo reciente demuestra que los ratones Ts1Cje son más activos en ambientes novedosos que en ambientes familiares, un fenómeno que los autores correlacionan con los mayores niveles de serotonina que presenta el cerebro de estos ratones (Shimohata et al., 2017).

Por otra parte, tal y como discuten Sago et al. (1998), los déficits en el comportamiento exploratorio son compatibles con deficiencias o daños en el hipocampo (Sandin et al., 1997). De manera interesante, el déficit de comportamiento exploratorio no se observó en los ratones Ts1Cje tratados con rapamicina, sugiriendo que este fármaco es capaz de normalizar la función hipocampal en este aspecto concreto. No obstante, y considerando la controversia que existe en torno al papel del hipocampo en el *test* “*object recognition*” (Balderas et al., 2008), también es posible que el efecto beneficioso de la rapamicina ocurra a nivel cortical, y no se descarta que pudiera estar relacionado de alguna manera con los niveles de serotonina, dada la

relación que existe entre la transmisión serotoninérgica y la vía mTOR (McMahon et al., 2015).

En un trabajo previo realizado por otro laboratorio (Fernandez y Garner, 2007) no se observaron deficiencias en el *test "object recognition"*. A pesar de las diferencias en los protocolos experimentales utilizados, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral están en consonancia con los publicados por estos autores. Así, cuando se excluyeron del análisis los animales incapaces de alcanzar el criterio previamente definido (exploración de los objetos durante al menos 20 s en un período de 10 min), no se detectaron diferencias en el índice de memoria entre animales WT, Ts1Cje o Ts1Cje RAPA.

El *test "Barnes maze"* permite la caracterización del aprendizaje y la memoria espacial, y es similar al *test "Morris Water Maze"*. A pesar de utilizarse con menor frecuencia en la literatura, el *test "Barnes maze"* ofrece ventajas notables en el caso del ratón, cuyo hábitat natural, a diferencia del de la rata (especie para la que se diseñó originalmente el *"Morris Water Maze"*) no es acuático. De este modo, como ya se ha mencionado, el *"Barnes maze"* es una prueba que implica un menor nivel de estrés para el ratón que el *"Morris Water Maze"*, lo que podría influir notablemente en el rendimiento de los animales (Hölscher, 1999). Quizás por ese motivo, no sea sorprendente que los resultados obtenidos en este trabajo difieran ligeramente de los publicados por Sago et al. (1998) utilizando el *test "Morris Water Maze"*. Así, mientras que estos autores concluyen que existen deficiencias de aprendizaje en los ratones Ts1Cje, dichas deficiencias no son apreciables en el *test "Barnes maze"*. De hecho, los animales Ts1Cje inyectados con vehículo mostraron un fenotipo de comportamiento relativamente particular durante la fase de entrenamiento, y un menor rendimiento que los animales Ts1Cje no tratados en la fase de prueba de memoria a 24 h. Estos hechos sugieren que el manejo previo y/o las inyecciones intraperitoneales de vehículo previas a la fase de aprendizaje influyen negativamente en la memoria y aprendizaje de los ratones Ts1Cje, y podría ser indicativo de una mayor susceptibilidad al estrés en estos animales.

En cualquier caso, aunque Sago et al. (1998) observaron una reducción estadísticamente significativa del rendimiento de los ratones Ts1Cje (en comparación

con el de los ratones WT) en el “*Morris Water Maze*”, en su estudio los animales trisómicos también mostraron una reducción de la latencia durante la fase de aprendizaje, y además los porcentajes de ocupación del cuadrante “*target*” durante la fase de prueba fueron superiores al 25%, de manera similar a lo obtenido en esta Tesis Doctoral con el test “*Barnes maze*”, demostrando que, realmente, los ratones Ts1Cje tienen capacidad de aprender y memorizar dicha tarea.

Por otra parte, también cabe destacar el hecho de que el sistema de cruce empleado por Sago et al. (machos Ts1Cje en un fondo genético CD1) era diferente al utilizado en esta Tesis Doctoral (que sigue las directrices de Jackson Laboratories, suministrador original de los ratones Ts1Cje). Es bien sabido que el fondo genético de los ratones tiene un notable impacto en su comportamiento (Holmes et al., 2002), por lo que este factor no puede descartarse como posible fuente de discrepancia en los resultados obtenidos.

A pesar de no observarse defectos notables de aprendizaje y memoria a largo plazo en los ratones Ts1Cje, la persistencia de la memoria a largo plazo, evaluada 8 días después del entrenamiento, sí resultó estar afectada, tanto en ratones trisómicos sin tratar como en los inyectados con vehículo. Además, la rapamicina también fue capaz de restaurar este fenotipo.

De manera interesante, se ha demostrado que la persistencia de la LTM requiere síntesis de proteínas en el hipocampo, así como una fase dependiente de BDNF (Bekinschtein et al., 2007). Los ratones Ts1Cje tienen una mayor tasa de traducción local en el hipocampo, debida a los niveles incrementados de BDNF y/o pro-BDNF, que producen la hiperactivación de la vía mTOR. De hecho, dicha tasa de traducción local se normaliza *in vitro* en presencia de rapamicina (Troca-Marín et al., 2011). Además, una importante forma de plasticidad sináptica dependiente de BDNF, la BDNF-LTP, está ausente en el hipocampo de los ratones Ts1Cje, y se recupera, *ex vivo*, en presencia de rapamicina (Andrade-Talavera et al., 2015). Aunque resulta tentador correlacionar los déficits de plasticidad observados en los ratones Ts1Cje con los de persistencia de la memoria, puesto que ambos fenotipos se recuperan por rapamicina, probablemente estos dos aspectos no sean directamente interdependientes. Por ejemplo, la rapamicina elimina la BDNF-LTP en rodajas de hipocampo WT (Tang et al., 2002; Andrade-Talavera

et al., 2015), pero solo produce efectos sutiles en la LTM determinada mediante “*Barnes maze*”, y ningún efecto sobre la persistencia de la LTM. A la inversa, a pesar de carecer completamente de BDNF-LTP, los ratones Ts1Cje no muestran afectación en la LTM, sugiriendo que (al menos en el “*Barnes maze*”) esta memoria depende de un tipo de plasticidad diferente a la BDNF-LTP. En ese sentido, otras formas de plasticidad están afectadas pero no completamente abolidas en los ratones Ts1Cje (Siarey et al., 2005), y podrían ser suficientes para mantener la memoria espacial durante ese período de tiempo relativamente corto (24 h). En particular, la vía Ras-ERK, que también está bajo el control del BDNF a través de receptores TrkB (Fig. 11), no está afectada en el hipocampo de ratones Ts1Cje (Troca-Marín et al., 2011). Además, los defectos de persistencia de la LTM observados en ratones Ts1Cje no tratados o bien tratados con vehículo podrían deberse a mecanismos corticales, más que a mecanismos hipocámpales (Alonso et al., 2005).

5.2. Modificación del proteoma sináptico hipocámpal por rapamicina en los ratones Ts1Cje

Como ya se ha mencionado, la vía mTOR está hiperactiva en el hipocampo de los ratones Ts1Cje, dando lugar a una mayor tasa de traducción local (determinada mediante el marcaje metabólico de sinaptoneurosomas) que además se normaliza en presencia de rapamicina (Troca-Marín et al., 2011). Por tanto, en esta Tesis Doctoral se caracterizaron las proteínas presentes en estas fracciones subcelulares y sus niveles relativos, tanto en ratones sin tratar, como en ratones tratados con rapamicina, con objeto de esclarecer las vías de señalización desreguladas a nivel sináptico en los ratones trisómicos, así como los posibles mecanismos que podrían mediar los efectos beneficiosos de la rapamicina en dichos ratones.

El protocolo de obtención de sinaptoneurosomas utilizado en esta Tesis fue puesto a punto en nuestro laboratorio (Troca-Marín et al., 2010), en colaboración con el Dr. Francisco J. Tejedor (Instituto de Neurociencias de Alicante), pero en la descripción original sólo se utilizaron algunos marcadores pre- y post-sinápticos para su

caracterización molecular. En esta Tesis Doctoral se ha podido constatar que, en efecto, el proteoma de las fracciones subcelulares de hipocampo obtenidas mediante dicho protocolo experimental corresponde a lo esperado. En particular, se observó un enriquecimiento notable en proteínas de las vesículas sinápticas, en proteínas implicadas en el tráfico de vesículas sinápticas (complejo SNARE, endosomas, vesículas recubiertas de clatrina), proteínas de la densidad post-sináptica, receptores de glutamato (tanto metabotrópicos como ionotrópicos) y otras proteínas implicadas en transmisión glutamatérgica, plasticidad sináptica y regulación de la morfogénesis de espinas dendríticas, por mencionar algunas. En consonancia con la alta demanda energética del terminal pre-sináptico y la presencia de mitocondrias en el mismo, en estas fracciones subcelulares también estuvieron muy representadas las proteínas implicadas en el metabolismo de piruvato, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la fosforilación oxidativa. De forma muy interesante, los SNs hipocámpales resultaron estar también muy enriquecidos en proteínas implicadas en traducción: proteínas del ribosoma, aminoacil-tRNA-sintetasas, chaperonas, factores de iniciación y de elongación de la traducción, ribonucleoproteínas. Todo esto apoya la importancia que tiene el proceso de traducción local en el hipocampo (Cajigas et al., 2012).

De manera llamativa, no se observaron grandes cambios en el proteoma sináptico de los ratones Ts1Cje en comparación al WT. Sin embargo, otros autores han mostrado previamente que en realidad existen pocas diferencias entre los transcriptomas WT y Ts1Cje (Guedj et al., 2015; Ling et al., 2014). Por ejemplo, Guedj et al. (2015) identificaron solo 30 genes expresados de forma diferencial en el hipocampo Ts1Cje (considerando un *cutoff* de 1,2). Por otra parte, en consonancia con los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral, la caracterización del proteoma sináptico de ratones Ts65Dn, el modelo de SD más estudiado, también reveló la existencia de un proteoma prácticamente normal (Fernandez et al., 2009), puesto que en este trabajo los autores identificaron cambios solo en 23 proteínas (considerando un *cutoff* de 1,15).

No obstante, es bien conocido el hecho de que la cuantificación mediante iTRAQ tiende a subestimar las diferencias relativas de expresión entre muestras (Unwin et al., 2010).

En cualquier caso, en este trabajo se detectaron cambios proteómicos que sugieren una alteración de la función mitocondrial en SNs Ts1Cje, de acuerdo con los datos previamente publicados (Shukkur et al., 2006). Por otra parte, es bien conocido que mTOR regula la biogénesis de las mitocondrias y el metabolismo de éstas, y que la rapamicina, al inhibir mTOR, disminuye el potencial de membrana, el consumo de oxígeno y los niveles de ATP de estos orgánulos, además de reducir la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo oxidativo (revisado Laplante y Sabatini, 2009). Todo ello concuerda con la disfunción mitocondrial y, sobre todo, la afectación de la fosforilación oxidativa detectada en el análisis proteómico de los SNs WT RAPA. De forma curiosa, aunque los niveles de proteínas pertenecientes a estas rutas canónicas también están notablemente alterados en las muestras SNs Ts1Cje RAPA, se observó más bien un incremento de los mismos en este último caso, en contraposición a lo que ocurre en las muestras SNs WT RAPA, donde, en general, se detectó una reducción de los niveles de dichas proteínas (Fig. 28). Por tanto, aunque el análisis de actividad (basado en el *Z score*) no está disponible en IPA para estas vías de señalización, en líneas generales la rapamicina parece tener un efecto opuesto en los ratones WT y Ts1Cje en lo que se refiere a las mismas.

Por otra parte, específicamente en las muestras de SNs WT RAPA, se detectó un incremento de los niveles de proteínas implicadas en la degradación de aminoácidos (valina, isoleucina y triptófano). Esta inducción del catabolismo de aminoácidos podría guardar relación con el hecho de que la rapamicina induce autofagia y, por tanto, degradación de proteínas (Zhao et al., 2015).

La rapamicina también mostró efectos opuestos sobre las rutas relacionadas con plasticidad sináptica en los ratones WT y Ts1Cje. De este modo, en SNs WT RAPA, el análisis *Z score* de IPA predijo una inhibición de las vías ERK/MAPK, proteína quinasa A, señalización por calcio y LTP, así como una activación de las vías eIF4E y p70S6K, mientras que dichas rutas se estarían ligeramente activadas o completamente normalizadas en SNs Ts1Cje RAPA. Estas predicciones en base a los datos proteómicos obtenidos estarían en consonancia con el hecho de que la rapamicina tenga un efecto negativo sobre la BDNF-LTP en rodajas de hipocampo WT pero positivo en el caso de rodajas Ts1Cje (Andrade-Talavera et al., 2015).

Pero, ¿cuál es la causa primaria de estas diferencias? El análisis detallado de los cambios proteómicos que afectan a la vía mTOR en ambas circunstancias (WT RAPA *versus* Ts1Cje RAPA) puso de manifiesto una disminución de FKBP1, AKT1/3, ERK1/2 (también denominados MAPK3 y MAPK1, respectivamente) y TSC2 específicamente en SNs Ts1Cje RAPA, mientras que en SNs WT RAPA, AKT2 estaba incrementada y PKC α/β disminuidas.

La función “*Molecule Activity Predictor*” de IPA permite predecir los efectos de la activación o inhibición de las distintas proteínas que forman parte de una ruta de señalización determinada. Al aplicar esta función a la vía mTOR con los valores de expresión de las proteínas correspondientes para las muestras SNs WT RAPA y SNs Ts1Cje RAPA, el algoritmo predijo una inhibición de los complejos mTORC1 y mTORC2, así como una activación de la autofagia (como ya se ha comentado anteriormente) y de la traducción en el caso WT RAPA, y todo lo contrario, es decir, activación de los complejos mTORC1 y mTORC2 e inhibición de la autofagia y de la traducción, en el caso Ts1Cje RAPA (Fig. 29). Aunque todos estos cambios proteómicos deben confirmarse mediante técnicas complementarias, uno de ellos resulta especialmente interesante: FKBP1, ya que es la proteína a la que se une la rapamicina para formar el complejo inhibidor de mTOR. Al tratarse de factores limitantes, se ha demostrado que la respuesta a rapamicina depende de la concentración de esta proteína y otras pertenecientes a la misma familia (FKBPs en general) (Schreiber et al., 2015).

En comparación con los SNs WT RAPA, los SNs Ts1Cje RAPA presentaron menores niveles de FKBP1. Esto podría generar una menor sensibilidad a la rapamicina en los ratones trisómicos, lo que produciría una menor inhibición de la vía mTOR en comparación con los ratones WT, quedando esta ruta relativamente compensada. Así podría explicarse por qué los ratones Ts1Cje tratados con rapamicina no experimentan los efectos negativos que este fármaco tiene sobre la plasticidad sináptica en los animales WT (Andrade-Talavera et al., 2015).

Trabajos futuros permitirán profundizar en este aspecto, con objeto de determinar si, efectivamente, el tratamiento prolongado con rapamicina tiene un impacto sobre los niveles sinápticos de FKBPs en los ratones trisómicos, y esclarecer las causas de la respuesta diferencial a la rapamicina en ratones WT y Ts1Cje.

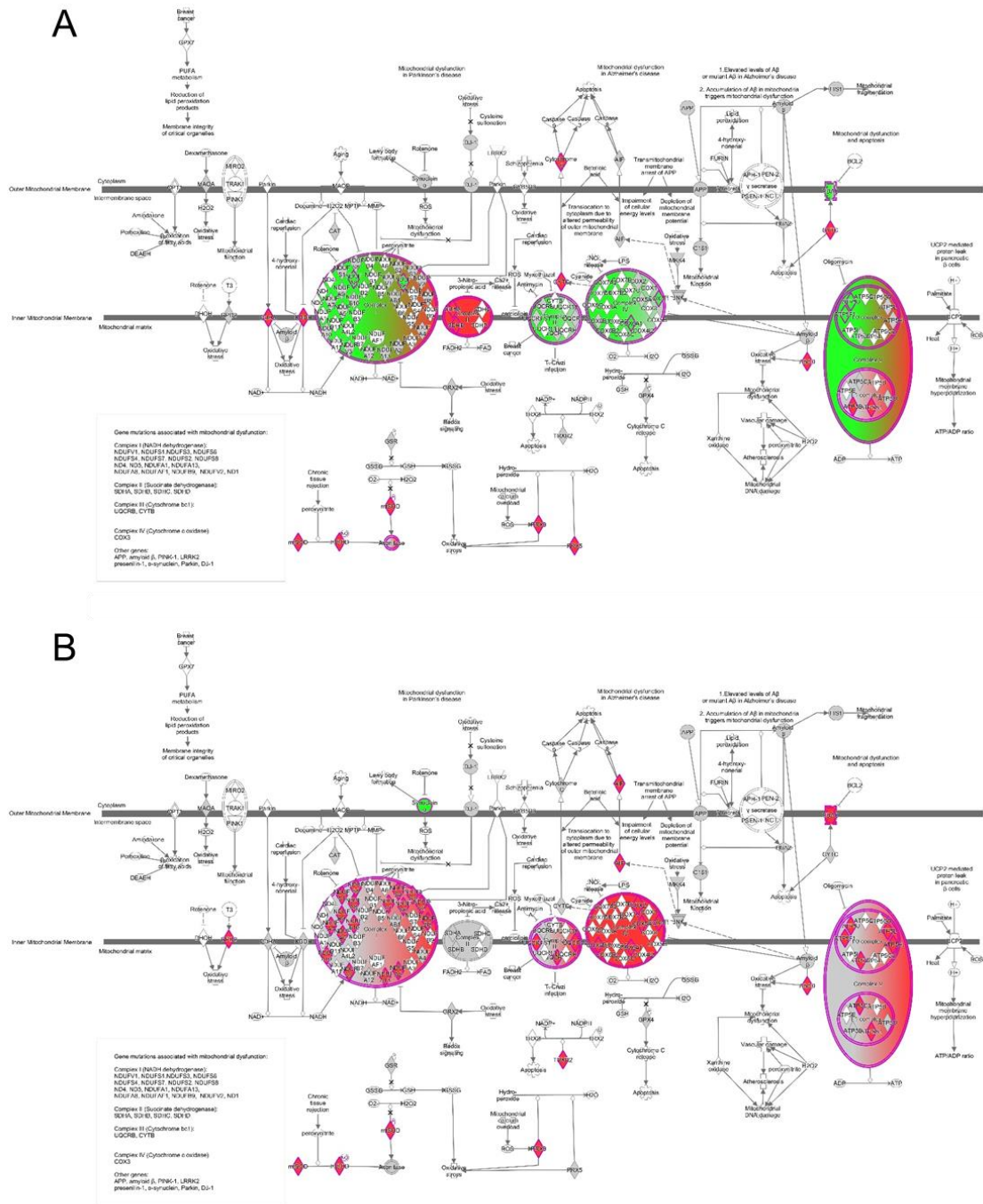


Figura 28. Análisis de las vías de disfunción mitocondrial y fosforilación oxidativa mediante IPA en SNs de ratones WT RAPA (A) y Ts1Cje RAPA (B). Se muestran en verde las proteínas que muestran niveles de expresión reducidos, y en rojo las que muestran valores incrementados (respecto a SNs WT de ratones sin tratar). En gris se indican las proteínas sin cambios, y en blanco las proteínas no detectadas en el análisis proteómico.

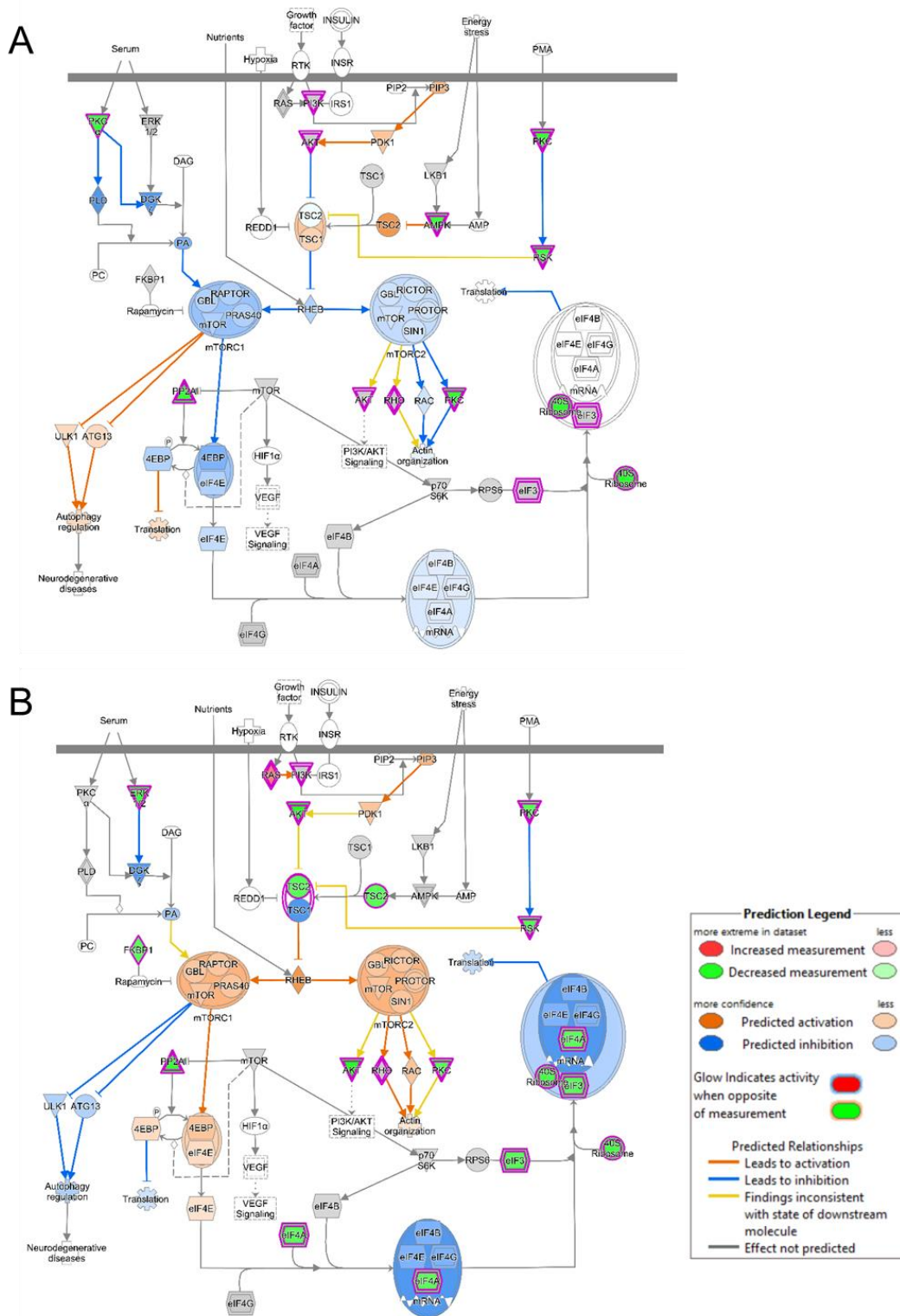


Figura 29. Predicción de la actividad de la vía mTOR en SNs de ratones WT RAPA (A) y Ts1Cje RAPA (B) mediante la función de IPA “Molecule Activity Predictor”. Se muestran en verde las proteínas que muestran niveles de expresión reducidos, y en rojo las que muestran valores incrementados (respecto a SNs WT de ratones sin tratar). Considerando esos valores, el algoritmo indica las proteínas y complejos proteicos de la vía predictiblemente activados (en naranja) o inhibidos (en azul).

6. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos mediante el *test* de comportamiento "*object recognition*" muestran que los ratones Ts1Cje presentan una actividad exploratoria reducida, tanto en la fase de familiarización como en la fase de prueba. Dicho déficit es revertido con la administración de rapamicina.
2. A pesar de que los ratones Ts1Cje no muestran defectos evidentes de aprendizaje y de memoria a largo plazo ni en el *test* "*object recognition*" ni en el *test* "*Barnes maze*", la persistencia de la memoria a largo plazo en este último caso, evaluada a los 8 días del entrenamiento, sí se vio afectada. El tratamiento de los ratones mediante inyección intraperitoneal de rapamicina también fue capaz de restaurar dicho fenotipo.
3. Los sinaptoneurosomas de hipocampo de ratón están muy enriquecidos en proteínas implicadas en traducción, tales como proteínas del ribosoma, aminoacil-tRNA-sintetasas, chaperonas, y factores de iniciación y de elongación de la traducción, en consonancia con el importante papel que tiene la traducción local en esta región del cerebro.
4. El proteoma sináptico de hipocampo de los ratones Ts1Cje es muy similar al de los ratones silvestres, detectándose diferencias en los niveles de expresión de un bajo número de proteínas, entre las que se incluyen proteínas de la ruta canónica de disfunción mitocondrial.
5. Los diferentes niveles de expresión de proteínas presentes en sinaptoneurosomas de ratones silvestres y Ts1Cje, tratados con rapamicina, sugieren que este fármaco tiene efectos opuestos en ambos casos. Así, en los sinaptoneurosomas de ratones silvestres tratados con rapamicina los niveles de proteínas implicadas en fosforilación oxidativa están, en general, reducidos, y diversas rutas que participan en plasticidad sináptica se encuentran

predictiblemente inhibidas, mientras que por el contrario, en sinaptoneurosomas de ratones Ts1Cje tratados con rapamicina los niveles de proteínas que participan en fosforilación oxidativa están incrementados, y las rutas involucradas en plasticidad sináptica están predictiblemente normalizadas o ligeramente activadas.

6. Resultados preliminares confirman que los niveles de la proteína FKBP1, diana molecular de la rapamicina, están más reducidos en los sinaptoneurosomas de ratones Ts1Cje tratados con rapamicina que en los de ratones silvestres tratados con rapamicina. Esta diferencia podría explicar la menor sensibilidad de los ratones trisómicos al efecto inhibitorio de la rapamicina.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abrous, D. N., & Wojtowicz, J. M. (2015). Interaction between Neurogenesis and Hippocampal Memory System: New Vistas. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(6), a018952.
- Aldridge, K., Reeves, R. H., Olson, L. E., & Richtsmeier, J. T. (2007). Differential effects of trisomy on brain shape and volume in related aneuploid mouse models. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 143A(10), 1060–1070.
- Alonso, M., Bekinschtein, P., Cammarota, M., Vianna, M. R. M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2005). Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learning & Memory*, 12(5), 504–510.
- Andersen, P. (2007). *The hippocampus book*. Oxford University Press.
- Andrade-Talavera, Y., Benito, I., Casas, J. J., Rodríguez-Moreno, A., & Montesinos, M. L. (2015). Rapamycin restores BDNF-LTP and the persistence of long-term memory in a model of Down's syndrome. *Neurobiology of Disease*, 82, 516–525. [h](#)
- Antonarakis, S. E., Lyle, R., Dermitzakis, E. T., Reymond, A., & Deutsch, S. (2004). Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nature Reviews. Genetics*, 5(10), 725–38.
- Bahn, S., Mimmack, M., Ryan, M., Caldwell, M. A., Jauniaux, E., Starkey, M., ... Emson, P. (2002). Neuronal target genes of the neuron-restrictive silencer factor in neurospheres derived from fetuses with Down's syndrome: a gene expression study. *Lancet (London, England)*, 359(9303), 310–5.
- Balderas, I., Rodríguez-Ortiz, C. J., Salgado-Tonda, P., Chavez-Hurtado, J., Mcgaugh, J. L., & Bermudez-Rattoni, F. (2008). The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe.
- Bartesaghi, R., Guidi, S., & Ciani, E. (2011). Is it possible to improve neurodevelopmental abnormalities in Down syndrome? *Reviews in the Neurosciences*, 22(4).
- Becker, L. E., Armstrong, D. L., & Chan, F. (1986). Dendritic atrophy in children with Down's syndrome. *Annals of Neurology*, 20(4), 520–526.

- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L. M., Bevilacqua, L. R. M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2007). Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF- Dependent Phase in the Hippocampus. *Neuron*, *53*(2), 261–277.
- Belichenko, P. V., Masliah, E., Kleschevnikov, A. M., Villar, A. J., Epstein, C. J., Salehi, A., & Mobley, W. C. (2004). Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of down syndrome. *The Journal of Comparative Neurology*, *480*(3), 281–298.
- Belichenko, P. V., Kleschevnikov, A. M., Salehi, A., Epstein, C. J., & Mobley, W. C. (2007). Synaptic and cognitive abnormalities in mouse models of Down syndrome: exploring genotype-phenotype relationships. *The Journal of Comparative Neurology*, *504*(4), 329–45.
- Benavides-Piccione, R., Ballesteros-Yáñez, I., Martínez de Lagrán, M., Elston, G., Estivill, X., Fillat, C., ... Dierssen, M. (2004). On dendrites in Down syndrome and DS murine models: a spiny way to learn. *Progress in Neurobiology*, *74*(2), 111–126.
- Briz, V., Hsu, Y.-T., Li, Y., Lee, E., Bi, X., & Baudry, M. (2013). Calpain-2-mediated PTEN degradation contributes to BDNF-induced stimulation of dendritic protein synthesis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(10), 4317–28.
- Bussy, G., Charrin, E., Brun, A., Curie, A., & des Portes, V. (2011). Implicit procedural learning in fragile X and Down syndrome. *Journal of Intellectual Disability Research*, *55*(5), 521–528.
- Cajigas, I. J., Tushev, G., Will, T. J., tom Dieck, S., Fuerst, N., & Schuman, E. M. (2012). The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging. *Neuron*, *74*(3), 453–66.
- Cammalleri, M., Lütjens, R., Berton, F., King, A. R., Simpson, C., Francesconi, W., & Sanna, P. P. (2003). Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(24), 14368–73.

- Carlesimo, G. A., Marotta, L., & Vicari, S. (1997). Long-term memory in mental retardation: Evidence for a specific impairment in subjects with Down's syndrome. *Neuropsychologia*, *35*(1), 71–79.
- Carr, J., & Collins, S. (2014). Ageing and dementia in a longitudinal study of a cohort with Down syndrome. *Journal of Applied Research in Intellectual Disabilities: JARID*, *27*(6), 555–63.
- Contestabile, A., Benfenati, F., & Gasparini, L. (2010). Communication breaks-Down: From neurodevelopment defects to cognitive disabilities in Down syndrome. *Progress in Neurobiology*, *91*, 1–22.
- Contestabile, A., Fila, T., Ceccarelli, C., Bonasoni, P., Bonapace, L., Santini, D., ... Ciani, E. (2007). Cell cycle alteration and decreased cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus and in the neocortical germinal matrix of fetuses with Down syndrome and in Ts65Dn mice. *Hippocampus*, *17*(8), 665–78.
- Coyle, J. T., Oster-Granite, M. L., & Gearhart, J. D. (1986). The neurobiologic consequences of Down syndrome. *Brain Research Bulletin*, *16*(6), 773–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2875770>
- Crawley, J. N. (2007). *What's wrong with my mouse?: Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice*. Wiley.
- Dierssen, M. (2012). Down syndrome: the brain in trisomic mode. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(12), 844–858.
- Duchon, A., Raveau, M., Chevalier, C., Valérie, @bullet, @bullet, N., Sharp, A. J., & Herault, Y. (2011). Identification of the translocation breakpoints in the Ts65Dn and Ts1Cje mouse lines: relevance for modeling down syndrome.
- Engidawork, E., & Lubec, G. (2003). Molecular changes in fetal Down syndrome brain. *Journal of Neurochemistry*, *84*(5), 895–904. Retrieved from
- Epstein, C. J. (1990). The consequences of chromosome imbalance. *American Journal of Medical Genetics*, *37*(S7), 31–37.

- Esposito, G., Imitola, J., Lu, J., De Filippis, D., Scuderi, C., Ganesh, V. S., ... Sheen, V. (2008). Genomic and functional profiling of human Down syndrome neural progenitors implicates S100B and aquaporin 4 in cell injury. *Human Molecular Genetics*, *17*(3), 440–57.
- Fernandez, F., & Garner, C. C. (2007). Object recognition memory is conserved in Ts1Cje, a mouse model of Down syndrome. *Neuroscience Letters*, *421*, 137–141.
- Fernandez, F., Trinidad, J. C., Blank, M., Feng, D.-D., Burlingame, A. L., & Garner, C. C. (2009). Normal protein composition of synapses in Ts65Dn mice: a mouse model of Down syndrome. *Journal of Neurochemistry*, *110*(1), 157–69.
- Ferrer, I., & Gullotta, F. (1990). Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta Neuropathol*, *79*, 680–685.
- Frödin, M., Jensen, C. J., Merienne, K., & Gammeltoft, S. (2000). A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1. *The EMBO Journal*, *19*(12), 2924–34.
- Guedj, F., Pennings, J. L. A., Wick, H. C., & Bianchi, D. W. (2015). Analysis of Adult Cerebral Cortex and Hippocampus Transcriptomes Reveals Unique Molecular Changes in the Ts1Cje Mouse Model of Down Syndrome. *Brain Pathology*, *25*(1), 11–23.
- Guihard-Costa, A.-M., Khung, S., Delbecque, K., Ménez, F., & Delezoide, A.-L. (2006). Biometry of Face and Brain in Fetuses with Trisomy 21. *Pediatric Research*, *59*(1), 33–38.
- Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T. D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H. S., ... Eglitis, M. A. (2001). The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*, *89*(5), 311–319.
- Hewitt, C. A., Ling, K.-H., Merson, T. D., Simpson, K. M., Ritchie, M. E., King, S. L., ... Voss, A. K. (2010). Gene Network Disruptions and Neurogenesis Defects in the Adult Ts1Cje Mouse Model of Down Syndrome.

- Holmes, A., Wrenn, C. C., Harris, A. P., Thayer, K. E., & Crawley, J. N. (2002). Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes, Brain, and Behavior*, 1(1), 55–69.
- Hölscher, C. (1999). Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behavioural Brain Research*, 100(1–2), 225–35.
- Hou, L., & Klann, E. (2004). Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(28), 6352–61.
- Ishihara, K., Amano, K., Takaki, E., Shimohata, A., Sago, H., J. Epstein, C., & Yamakawa, K. (2010). Enlarged Brain Ventricles and Impaired Neurogenesis in the Ts1Cje and Ts2Cje Mouse Models of Down Syndrome. *Cerebral Cortex*, 20(5), 1131–1143.
- Ishita Das and Roger H.Reeves. (2011). The use of mouse models to understand and improve cognitive deficits in Down syndrome. *Disease Models & Mechanisms*, 4, 596–606.
- Jarrold, C., & Baddeley, A. D. (1997). Short-term Memory for Verbal and Visuospatial Information in Down's Syndrome. *Cognitive Neuropsychiatry*, 2(2), 101–22.
- Kaminker, P., & Armando, R. (2008). [Down syndrome: first part: clinical and genetic approach]. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 106(3), 249–59.
- Kates, W. R., Folley, B. S., Lanham, D. C., Capone, G. T., & Kaufmann, W. E. (2002). Cerebral growth in Fragile X syndrome: review and comparison with Down syndrome. *Microscopy Research and Technique*, 57(3), 159–67.
- Koo, B. K., Blaser, S., Harwood-Nash, D., Becker, L. E., & Murphy, E. G. (1992). Magnetic resonance imaging evaluation of delayed myelination in Down syndrome: a case report and review of the literature. *Journal of Child Neurology*, 7(4), 417–21.
- Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., & Bonhoeffer, T. (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

States of America, 92(19), 8856–60.

Lanfranchi, S., Cornoldi, C., & Vianello, R. (2004). Verbal and visuospatial working memory deficits in children with Down syndrome. *American Journal of Mental Retardation : AJMR*, 109(6), 456–66.

Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2009). An Emerging Role of mTOR in Lipid Biosynthesis. *Current Biology*, 19(22), R1046–R1052.

Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2013). Object recognition test in mice. *Nature Protocols*, 8(12), 2531–2537.

Ling, K.-H., Hewitt, C. A., Tan, K.-L., Cheah, P.-S., Vidyadaran, S., Lai, M.-I., ... Scott, H. S. (2014). Functional transcriptome analysis of the postnatal brain of the Ts1Cje mouse model for Down syndrome reveals global disruption of interferon-related molecular networks. *BMC Genomics*, 15(1), 624.

Linnarsson, S., Björklund, A., & Ernfors, P. (1997). Learning deficit in BDNF mutant mice. *The European Journal of Neuroscience*, 9(12), 2581–7.

Lott, I. T., & Dierssen, M. (2010). Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome. *The Lancet Neurology*, 9, 623–633.

Lyle, R., Béna, F., Gagos, S., Gehrig, C., Lopez, G., Schinzel, A., ... Antonarakis, S. E. (2009). Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 17(4), 454–66.

Marin-Padilla. (1972). Structural abnormalities of cerebral cortex in human chromosomal aberrations: a Golgi study. *Brain Research*.

Marin-Padilla, M. (1976). Pyramidal cell abnormalities in the motor cortex of a child with Down's syndrome. A Golgi study. *The Journal of Comparative Neurology*, 167(1), 63–81.

- McMahon, J. J., Yu, W., Yang, J., Feng, H., Helm, M., McMahon, E., ... Huang, Y. (2015). Seizure-dependent mTOR activation in 5-HT neurons promotes autism-like behaviors in mice. *Neurobiology of Disease*, *73*, 296–306.
- Mi, H., Muruganujan, A., & Thomas, P. D. (2013). PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D377–D386.
- Mizuno, M., Yamada, K., Olariu, A., Nawa, H., & Nabeshima, T. (2000). Involvement of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Spatial Memory Formation and Maintenance in a Radial Arm Maze Test in Rats.
- Moldrich, R. X., Dauphinot, L., Laffaire, J., Vitalis, T., Hérault, Y., Beart, P. M., ... Potier, M.-C. (2009). Proliferation deficits and gene expression dysregulation in Down's syndrome (Ts1Cje) neural progenitor cells cultured from neurospheres. *Journal of Neuroscience Research*, *87*(14), 3143–3152.
- Nadel, L. (2003). Down syndrome: A Genetic Disorder in Biobehavioral Perspective.
- Neves, G., Cooke, S. F., & Bliss, T. V. P. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature Reviews Neuroscience*, *9*(1), 65–75.
- Numminen, H., Service, E., Ahonen, T., & Ruoppila, I. (2001). Working memory and everyday cognition in adults with Down's syndrome. *Journal of Intellectual Disability Research : JIDR*, *45*(Pt 2), 157–68.
- Panja, D., & Bramham, C. R. (2014). BDNF mechanisms in late LTP formation: A synthesis and breakdown. *Neuropharmacology*, *76*, 664–676.
- Patterson, S. L., & Abel, T. (1996). Recombinant BDNF Rescues Deficits in Basal Synaptic Transmission and Hippocampal LTP in BDNF Knockout Mice. *Neuron*, *16*, 1137–1145.
- Pinter, J. D., Brown, W. E., Eliez, S., Schmitt, J. E., Capone, G. T., & Reiss, A. L. (2001). Amygdala and hippocampal volumes in children with Down syndrome: a high-resolution MRI study. *Neurology*, *56*(7), 972–4.

- Pritchard, M. A., & Kola, I. (1999). The “gene dosage effect” hypothesis versus the “amplified developmental instability” hypothesis in Down syndrome. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, *57*, 293–303.
- Reeves, R. H., Baxter, L. L., & Richtsmeier, J. T. (2001). Too much of a good thing: mechanisms of gene action in Down syndrome. *Trends in Genetics*, *17*(2), 83–88.
- Rueda, N., Flórez, J., & Martínez-Cué, C. (2012). Mouse models of Down syndrome as a tool to unravel the causes of mental disabilities. *Neural Plasticity*, *2012*, 584071.
- Sago, H., Carlson, E. J., Smith, D. J., Kilbridge, J., Rubin, E. M., Mobley, W. C., ... Huang, T.-T. (1998). Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Genetics*, *95*, 6256–6261.
- Sandin, J., Georgieva, J., Schött, P. A., Ögren, S. O., & Terenius, L. (1997). Nociceptin/Orphanin FQ Microinjected into Hippocampus Impairs Spatial Learning in Rats. *European Journal of Neuroscience*, *9*(1), 194–197.
- Schapiro, M. B., Luxenberg, J. S., Kaye, J. A., Haxby, J. V, Friedland, R. P., & Rapoport, S. I. (1989). Serial quantitative CT analysis of brain morphometrics in adult Down’s syndrome at different ages. *Neurology*, *39*(10), 1349–53.
- Schmidt-Sidor, B., Wisniewski, K. E., Shepard, T. H., & Sersen, E. A. (1990a). Brain growth in Down syndrome subjects 15 to 22 weeks of gestational age and birth to 60 months. *Clinical Neuropathology*, *9*(4), 181–90.
- Schreiber, K. H., Ortiz, D., Academia, E. C., Anies, A. C., Liao, C.-Y., & Kennedy, B. K. (2015). Rapamycin-mediated mTORC2 inhibition is determined by the relative expression of FK506-binding proteins. *Aging Cell*, *14*(2), 265–273.
- Shimohata, A., Ishihara, K., Hattori, S., Miyamoto, H., Morishita, H., Ornthanalai, G., ... Yamakawa, K. (2017). Ts1Cje Down syndrome model mice exhibit environmental stimuli-triggered locomotor hyperactivity and sociability concurrent with increased flux through central dopamine and serotonin metabolism. *Experimental Neurology*, *293*, 1–12.

- Shors, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y., & Gould, E. (2002). Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*, *12*(5), 578–584.
- Shott, S. R. (2006). Down syndrome: common otolaryngologic manifestations. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, *142C*(3), 131–40.
- Shukkur, E. A., Shimohata, A., Akagi, T., Yu, W., Yamaguchi, M., Murayama, M., ... Yamakawa, K. (2006). Mitochondrial dysfunction and tau hyperphosphorylation in Ts1Cje, a mouse model for Down syndrome. *Human Molecular Genetics*, *15*(18), 2752–62.
- Siarey, R. J., Villar, A. J., Epstein, C. J., & Galdzicki, Z. (2005). Abnormal synaptic plasticity in the Ts1Cje segmental trisomy 16 mouse model of Down syndrome. *Neuropharmacology*, *49*(1), 122–8.
- Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective.
- Sturgeon, X., & Gardiner, K. J. (2011). Transcript catalogs of human chromosome 21 and orthologous chimpanzee and mouse regions. *Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, *22*(5–6), 261–71.
- Sunyer, B., Patil, S., Höger, H. (2007). Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice : Protocol Exchange.
- Sylvester, P. E. (1983). The hippocampus in Down's syndrome. *Journal of Mental Deficiency Research*, *27* (Pt 3), 227–36.
- Sylvester, P. E. (2008). THE HIPPOCAMPUS IN DOWN'S SYNDROME. *Journal of Intellectual Disability Research*, *27*(3), 227–236.
- Tada, T., & Sheng, M. (2006). Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, *16*, 95–101.
- Takashima, S., Becker, L. E., Armstrong, D. L., & Chan, F. (1981). Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study. *Brain Research*, *225*(1), 1–21.

- Takashima, S., Ieshima, A., Nakamura, H., & Becker, L. E. (1989). Dendrites, dementia and the Down syndrome. *Brain & Development*, *11*(2), 131–3.
- Takei, N., Inamura, N., Kawamura, M., Namba, H., Hara, K., Yonezawa, K., & Nawa, H. (2004). Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(44), 9760–9.
- Tang, S. J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A.-C., Sonenberg, N., & Schuman, E. M. (2002). A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(1), 467–72.
- Teichmann, M., Dupoux, E., Kouider, S., & Bachoud-Lévi, A.-C. (2006). The Role of the Striatum in Processing Language Rules: Evidence from Word Perception in Huntington's Disease.
- Troca-Marín, J. A., Alves-Sampaio, A., & 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. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(26), 9445–55.
- Troca-Marín, J. A., Alves-Sampaio, A., Tejedor, F. J., & Montesinos, M. L. (2010). Local translation of dendritic RhoA revealed by an improved synaptoneurosome preparation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *43*(3), 308–314.
- Troca-Marín, J. A., Casañas, J. J., Benito, I., & Montesinos, M. L. (2014). The Akt-mTOR pathway in Down's syndrome: the potential use of rapamycin/rapalogs for treating cognitive deficits. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, *13*(1), 34–40.
- Tsokas, P., Ma, T., Iyengar, R., Landau, E. M., & Blitzer, R. D. (2007). Mitogen-activated protein kinase upregulates the dendritic translation machinery in long-term potentiation by controlling the mammalian target of rapamycin pathway. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*,

27(22), 5885–94.

- Unwin, R. D., Griffiths, J. R., & Whetton, A. D. (2010). Simultaneous analysis of relative protein expression levels across multiple samples using iTRAQ isobaric tags with 2D nano LC–MS/MS. *Nature Protocols*, 5(9), 1574–1582.
- Vicari, S., Bellucci, S., & Carlesimo, G. A. (2000). Implicit and explicit memory: a functional dissociation in persons with Down syndrome.
- Visu-Petra, L., Benga, O., Tincaş, I., & Miclea, M. (2007). Visual-spatial processing in children and adolescents with Down's syndrome: a computerized assessment of memory skills. *Journal of Intellectual Disability Research : JIDR*, 51(Pt 12), 942–52.
- Watson, C., Paxinos, G., & Puelles, L. (Luis). (2012). *The mouse nervous system*. Elsevier Academic Press.
- Williams, K. R., Wishart, J. G., Pitcairn, T. K., & Willis, D. S. (2005). Emotion recognition by children with Down syndrome: investigation of specific impairments and error patterns. *American Journal of Mental Retardation : AJMR*, 110(5), 378–92.
- Wishart, J. G. (2007). Socio-cognitive understanding: a strength or weakness in Down's syndrome? *Journal of Intellectual Disability Research : JIDR*, 51(Pt 12), 996–1005.
- Wisniewski, H. M., & Rabe, A. (1986). Discrepancy between Alzheimer-type neuropathology and dementia in persons with Down's syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 477, 247–60.
- Zadran, S., Jourdi, H., Rostamiani, K., Qin, Q., Bi, X., & Baudry, M. (2010). Brain-derived neurotrophic factor and epidermal growth factor activate neuronal m-calpain via mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(3), 1086–95.
- Zhou, J., Blundell, J., Ogawa, S., Kwon, C.-H., Zhang, W., Sinton, C., ... Parada, L. F. (2009). Pharmacological Inhibition of mTORC1 Suppresses Anatomical, Cellular, and Behavioral Abnormalities in Neural-Specific Pten Knock-Out Mice. *Journal of Neuroscience*, 29(6), 1773–1783.

8. ANEXOS

The Akt-mTOR Pathway in Down's Syndrome: The Potential Use of Rapamycin/Rapalogs for Treating Cognitive Deficits

José Antonio Troca-Marín¹, Juan José Casañas¹, Itziar Benito^{1,2} and María Luz Montesinos^{*,1}

¹*Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain*

²*Servicio de Animalario. Hospital Universitario Virgen Macarena (HUVVM), Sevilla, Spain*

Abstract: An increasing amount of evidence suggests that the dysregulation of the Akt-mTOR (Akt-mammalian Target Of Rapamycin) signaling network is associated with intellectual disabilities, such as fragile X, tuberous sclerosis and Rett's syndrome. The Akt-mTOR pathway is involved in dendrite morphogenesis and synaptic plasticity, and it has been shown to modulate both glutamatergic and GABAergic synaptic transmission. We have recently shown that the Akt-mTOR pathway is hyperactive in the hippocampus of Ts1Cje mice, a model of Down's syndrome, leading to increased local dendritic translation that could interfere with synaptic plasticity. Rapamycin and rapalogs are specific inhibitors of mTOR, and some of these inhibitors are Food and Drug Administration-approved drugs. In this review, we discuss the molecular basis and consequences of Akt-mTOR hyperactivation in Down's syndrome, paying close attention to alterations in the molecular mechanisms underlying synaptic plasticity. We also analyze the pros and cons of using rapamycin/rapalogs for the treatment of the cognitive impairments associated with this condition.

Keywords: Akt, Brain-Derived Neurotrophic Factor, Down's syndrome, local translation, mammalian Target of Rapamycin, rapamycin, trisomy 21, Ts1Cje.

INTRODUCTION

The Akt-mTOR signaling pathway plays a role in the regulation of a wide repertoire of cellular functions, including cell growth, proliferation, survival, cytoskeleton organization, autophagy, immunosuppression, inflammation, angiogenesis, response to hypoxia, glucose metabolism, transcription, ribosome biosynthesis, and translation. Not surprisingly, a number of proteins in the mTOR signaling network are involved in metabolic, inflammatory and neurological diseases [1, 2]. Moreover, several oncogenes and tumor suppressors belong to this pathway [3]. Thus, due to increasing evidence that links Akt-mTOR dysregulation to disease, Akt-mTOR inhibitors have recently attracted enormous interest. Rapamycin (sirolimus) and derivative compounds, collectively referred to as rapalogs (e.g., everolimus, temsirolimus, and deforolimus), are specific mTOR inhibitors. Rapamycin was first approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 1999 as an immunosuppressant for the prevention of graft rejection (Rapamune™, Wyeth). Since then, other uses of rapamycin (or rapalogs) have been approved, primarily for cancer treatment.

We have recently shown that the Akt-mTOR pathway is hyperactive in the hippocampus of the Down's syndrome (DS) mouse model Ts1Cje [4]. Given the key role of mTOR signaling in synaptic plasticity, memory and learning [5], we propose that Akt-mTOR is a suitable target for pharmacological intervention that could improve cognition in DS. In this review, we briefly summarize the specific

functions of the Akt-mTOR cascade in neurons. We analyze the possible molecular basis of the hyperactivation of mTOR in the DS hippocampus and how this hyperactivation can lead to altered synaptic plasticity. Finally, the potential of rapamycin/rapalogs for treating the cognitive deficits in DS is discussed.

THE AKT-mTOR PATHWAY IN NEURONS

Several stimuli are known to activate the Akt-mTOR cascade in neurons. It is known that Akt-mTOR signaling is triggered by neurotransmitters, namely glutamate, through the activation of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) and metabotropic glutamate (mGlu) receptors, or by neurotrophins, namely Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), through the activation of the TrkB (Tropomyosin receptor kinase B) receptor (Fig. 1). Moreover, it has been recently shown that insulin promotes dendritic spine formation in hippocampal neurons *via* the Akt-mTOR pathway following insulin receptor activation [6].

mTOR is known to be part of two different protein complexes: mTORC1 and mTORC2, which share some components but differ in others. For instance, Raptor protein (Regulatory associated protein of TOR) is found exclusively in mTORC1 [7, 8], and Rictor (Rapamycin insensitive companion of TOR) is only present in mTORC2 [9, 10]. Importantly, the two mTOR complexes phosphorylate distinct targets and differ in their sensitivity to rapamycin, which specifically inhibits mTORC1 [7-11]. As depicted in Fig. (1), mTORC1 phosphorylates two main downstream targets: S6 kinase (p70S6K) and eIF4E-binding proteins (4E-BPs). When activated (i.e., phosphorylated), p70S6K in turn phosphorylates the ribosomal protein S6, influencing translation of the so-called "5'TOP (tract of pyrimidines)

*Address correspondence to this author at the Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Universidad de Sevilla, Av. Sánchez-Pizjuán 4, E-41009 Sevilla, Spain; Tel: (+34) 954 55 98 66; Fax: (+34) 954 55 17 69; E-mail: mlmontesinos@us.es

mRNAs”, which encode a number of components of the translational apparatus [12]. Hence, mTORC1 activation enhances ribosome biogenesis and the rate of translation. When bound to eIF4E, 4E-BPs repress translation of the so-called “eIF4E-sensitive mRNAs” [13], precluding the formation of the translation initiation complex. These mRNAs contain complex 5'UTRs (untranslated regions), which give them a low rate of translation relative to normal mRNAs. When 4E-BPs are phosphorylated by mTORC1, they are released from the 5'cap mRNA structure, thus allowing the interaction of eIF4G with eIF4E to initiate translation (Fig. 1).

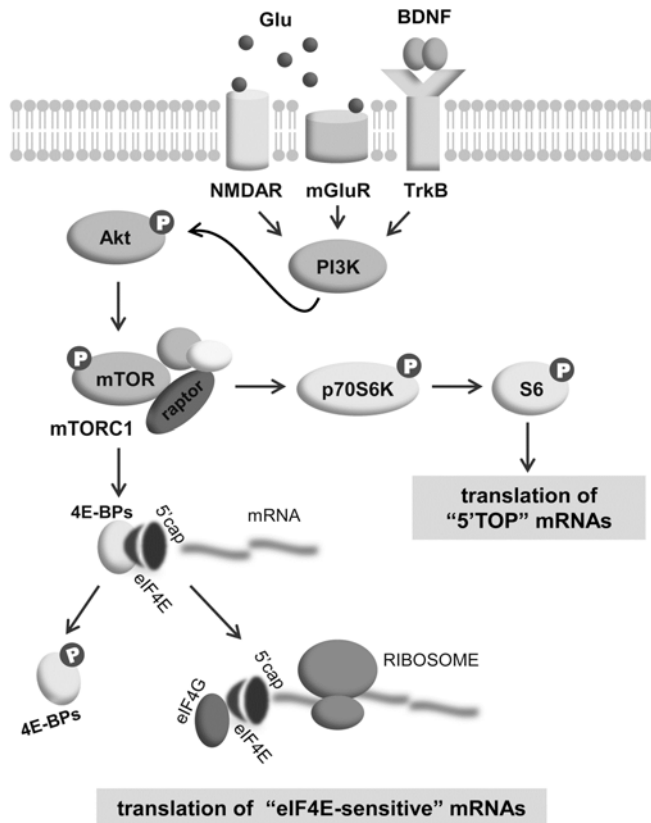


Fig. (1). The Akt-mTOR signaling pathway in neurons. Glutamate (Glu) and BDNF can stimulate different postsynaptic receptors to activate PI3 kinase (PI3K), which phosphorylates Akt and induces mTOR signaling. Consequently, the translation of “5'TOP” and “eIF4E sensitive” mRNAs is enhanced by different mechanisms.

In contrast to mTORC1, mTORC2 is insensitive to rapamycin, although it has been reported that long-term treatments with this drug inhibit mTORC2 activity in some cell lines [14]. mTORC2 phosphorylates Akt, PKC and other kinases [15] and has been implicated in actin cytoskeleton organization [10].

In addition to the long list of general cellular functions of Akt-mTOR, some specific roles have been reported in neurons, such as the regulation of dendrite morphogenesis [16-19] and synaptic plasticity [20-24]. In terms of dendritic morphogenesis, the transfection of hippocampal neurons with constitutively active forms of PI3K or Akt, which are upstream regulators of mTOR, results in increased dendrite branching [17], higher numbers of immature filopodia-like

protrusions in the dendrites, and a decrease in the density of mature dendritic spines [16]. Remarkably, rapamycin abolishes all of these phenotypes [16, 17]. Moreover, knockdown of mTOR or p70S6K results in a decrease in dendritic branching [17]. Additionally, in the mature brain, mTOR has been shown to participate in dendritic growth [19], and Akt-mTOR signaling is involved in different forms of synaptic plasticity. Thus, rapamycin inhibits late long-term potentiation (L-LTP) in the hippocampal CA1 region [20, 21, 24] by blocking mTOR-mediated dendritic synthesis of proteins in response to NMDA receptor (NMDAR) activation [25-27]. Akt-mTOR activation is also involved in BDNF-induced potentiation in the hippocampus [20]. Conversely, mTOR inhibition either with rapamycin or with anti-BDNF antibodies impedes the formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory in rodents [28-30]. Finally, long-term depression (LTD), which is mediated by metabotropic glutamate receptors (mGluRs) in the CA1 region, also depends on Akt-mTOR signaling [22] and local dendritic translation [31].

Because dendrite morphogenesis and synaptic plasticity are altered in nearly all cognitive syndromes, the functions of Akt-mTOR signaling are important in that context, and recent studies have proposed that the Akt-mTOR cascade is at the “crossroads” of the molecular mechanisms leading to intellectual disability [2]. Thus, the hyperactivation of Akt-mTOR has been reported in mouse models of fragile X [32, 33] and tuberous sclerosis [34], while a murine model of Rett’s syndrome shows mTOR hypoactivation [35].

POSSIBLE AKT-mTOR PATHWAY DYSFUNCTION IN DS

We have recently found that the Akt-mTOR cascade is hyperactivated in the dendrites of hippocampal neurons in Ts1Cje mice [4], a well-known DS model [36]. This mouse is trisomic for a fragment of chromosome 16 that contains numerous human chromosome 21 orthologs, including the Down Syndrome Critical Region (DSCR), which is crucial for the DS cognitive phenotype [37-39]. Accordingly, as is the case in DS [40], Ts1Cje mice show dendritic defaults [41], altered synaptic plasticity and memory deficits [36, 41-43], reduced cerebellar volume [44], impaired neurogenesis [45-47], and anomalies in the craniofacial skeleton [48].

We found that the levels of phospho-Akt (Ser473), phospho-mTOR (Ser2448), phospho-p70S6K (Thr389), phospho-S6 (Ser235/236), and phospho-4EBP1 (Ser65) are increased approximately 2-fold in dendrites of Ts1Cje-derived hippocampal neurons relative to their wild-type counterparts and, consequently, that local translation rates are also augmented [4]. This increase is physiologically relevant, since it is similar to that produced by BDNF in wild-type neurons [4, 49].

Interestingly, the hippocampal levels of BDNF and pro-BDNF are increased in Ts1Cje mice. Thus, when cultured Ts1Cje hippocampal neurons were treated with scavengers specific for these neurotrophins (TrkB-Fc or p75NTR-Fc), the phosphorylation levels of the Akt-mTOR pathway proteins were restored, strongly suggesting that the hyperactivation of the Akt-mTOR cascade in the Ts1Cje

hippocampus is due to the increased extracellular levels of BDNF and/or pro-BDNF [4].

Dendrites are known to secrete BDNF and pro-BDNF in response to NMDAR activation [50]. Afterwards, pro-BDNF is converted to mature BDNF by extracellular proteases. We found evidence of the increased basal activity of NMDARs in the Ts1Cje hippocampus. Thus, dendritic levels of DSCAM (Down Syndrome Cell Adhesion Molecule) protein, which are regulated by NMDAR-mediated synaptic activity, are abnormally increased in Ts1Cje hippocampal neurons. Remarkably, although APV (2-amino-5-phosphonovaleric acid, a specific NMDAR inhibitor) reduces the dendritic levels of DSCAM in Ts1Cje neurons, incubation with NMDA does not produce further increases [51].

Taking these data together, we have proposed the "glutamatergic positive-feedback loop" hypothesis to explain some of the complex synaptic plasticity defects in Ts1Cje mice [4]. In this model (Fig. 2), increased NMDAR activity could account for the enhanced postsynaptic BDNF and/or pro-BDNF release, thus leading to Akt-mTOR hyperactivation and increased local dendritic translation rates [4]. Because *BDNF* mRNA is locally translated, the increased local dendritic translation rates could in turn contribute to the augmented BDNF/pro-BDNF levels measured in Ts1Cje dendrites [52]. Furthermore, BDNF could stimulate synaptic glutamatergic activity by enhancing glutamate release [53, 54] and NMDAR signaling [55-58]. Hence, this glutamate-BDNF feedback positive loop could yield a "synaptic saturation state" that could impair synaptic plasticity. A number of observations further support this model: 1) the incubation of hippocampal Ts1Cje neurons with BDNF does not increase the activity of the Akt-mTOR pathway [4]; 2) the incubation of hippocampal Ts1Cje synaptoneurosome with BDNF does not increase the rates of local translation [4]; 3) inhibitors of NMDAR, such as memantine, APV or MK-801, reduce the dendritic levels of phospho-mTOR (Ser2448) in Ts1Cje hippocampal neurons [4]; 4) remarkably, the BDNF plasma levels in DS patients are higher than in control individuals [59, 60], which likely reflects the increased BDNF levels in brain [61, 62]; and 5) there is a possible dysregulation of mTOR in Ts65Dn mice, which is the most widely used DS model. Hence, increased phospho-Akt (Ser473) levels in Ts65Dn hippocampal extracts have been reported [63, 64]. However, in contrast to what is observed in Ts1Cje mice and possibly in the DS brain, normal or even decreased BDNF levels have been reported in the Ts65Dn hippocampus [65-71]. Nevertheless, it must be stressed that these studies have been conducted using total extracts, which could mask the possible differences in neuronal compartments such as the dendrites, which are crucial for synaptic plasticity. Thus, to establish a consensus on a model, it would be of great interest to determine the possible alterations of dendritic levels of BDNF/pro-BDNF in Ts65Dn and DS neurons, as well as possible differences in the secreted levels of these neurotrophins.

Nonetheless, some important questions must be answered to definitively characterize the potential role of mTOR signaling hyperactivation in the alterations of synaptic

plasticity that lead to the cognitive deficits observed in DS. For instance, it remains unclear which step of the glutamate-BDNF loop is initially disrupted in trisomic neurons. The overexpression of two human chromosome 21 genes belonging to the DSCR, *MNB/DYRK1A* and *DSCR1* (also known as *RCAN1*) has been suggested to mediate NMDAR dysregulation in Ts65Dn mice [70, 72]. Specifically, the overexpression of *MNB/DYRK1A* prolongs calcium uptake after NMDAR stimulation [73]. Moreover, *DSCR1*, which encodes a calcineurin inhibitor, increases both the probability and the duration of NMDAR opening [74]. Thus, both the *MNB/DYRK1A* and *DSCR1* genes, which are also triplicated in Ts1Cje, could be responsible for the basal increased glutamatergic activity in the trisomic hippocampus.

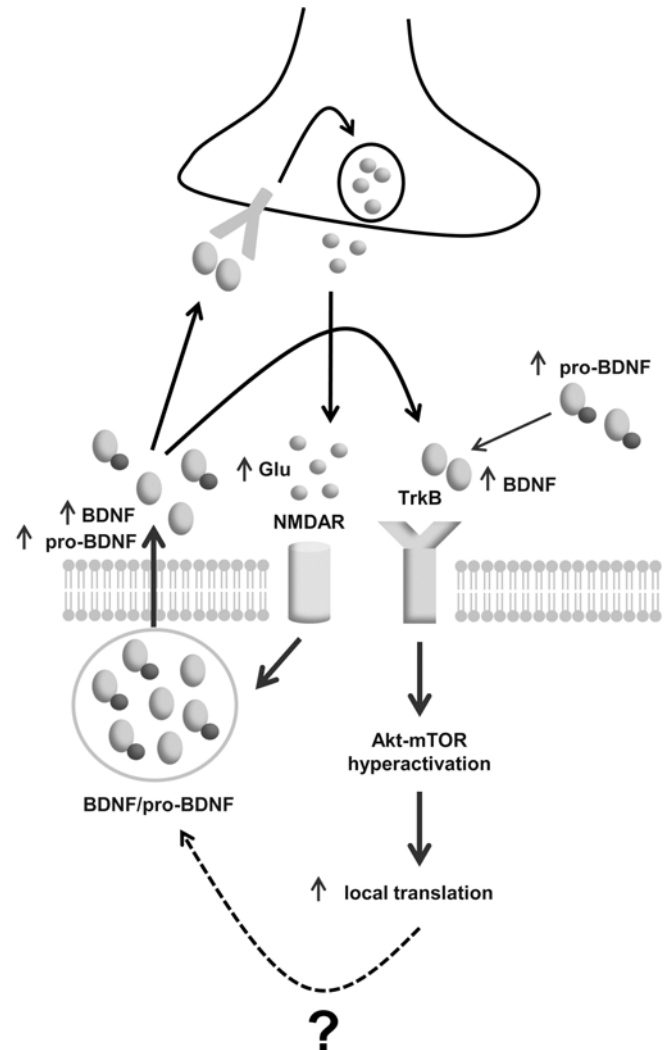


Fig. (2). The glutamatergic positive-feedback loop hypothesis in DS. Increased glutamatergic activity via NMDARs induces the enhanced release of BDNF/proBDNF proteins. Pro-BDNF extracellularly matures into BDNF. The increase in extracellular BDNF in turn induces postsynaptic Akt-mTOR hyperactivation via the TrkB receptors. Consequently, the local translation of dendritic mRNAs is augmented, which most likely includes the translation of *BDNF* mRNA. The presynaptic release of glutamate is stimulated by BDNF, which contributes to the enhanced glutamatergic activity.

Another key question that remains unanswered is which aspects of the hippocampal synaptic plasticity are affected by Akt-mTOR hyperactivation. Because mTOR signaling is known to participate in CA1 plasticity (i.e., NMDAR-dependent L-LTP, BDNF-dependent potentiation, and mGluR-dependent LTD [20-22]), in principle, these forms of CA1 plasticity are expected to be altered. Remarkably, rapamycin does not block L-LTP in the dentate gyrus, suggesting that mTOR is not involved in this type of plasticity [75]. In fact, reduced LTP in the dentate gyrus of the Ts1Cje and Ts65Dn mouse models is due to enhanced GABAergic (but not glutamatergic) activity [41, 76]. Therefore, it would be important to assess whether rapamycin restores impaired CA1 plasticity in DS mouse models [42, 77-79].

Sustained hyperactive mTOR signaling has been recently shown to enhance both GABAergic and glutamatergic synaptic transmission by increasing the number of synapses, the number of synaptic vesicles ready to be released, and the amplitude of the miniature postsynaptic currents [80]. It is therefore tempting to speculate that presynaptic mTOR hyperactivation could be responsible for the potentiation of the glutamatergic [51, 72] and GABAergic [41, 76] activity reported in the hippocampus of DS mouse models.

In summary, we believe that alterations in Akt-mTOR signaling are crucial to the complex synaptic plasticity phenotype of DS mouse models. This supports our proposal that Akt-mTOR is a novel drug target for DS therapy.

RAPAMYCIN AND RAPALOGS

Rapamycin and rapalogs interact with FKBP12 (FK506 binding protein 12), a cytoplasmic immunophilin. This complex then binds to the FRB (FKBP12-rapamycin binding) domain of mTOR (Fig. 3A), thus inhibiting the phosphorylation of downstream mTOR targets. Although the underlying mechanism of this inhibition remains largely unknown, it has been proposed that it involves the dissociation of Raptor from mTOR and, consequently, the disruption of mTORC1 binding to its targets [81]. Rapamycin is a macrolide ester (Fig. 3B) that is FDA-approved as an immunosuppressant. It is used to prevent graft rejection, to treat restenosis, and due to its antiproliferative activity, to treat certain types of cancer. Rapamycin is effective in the nanomolar range; however, some of its pharmacological properties are not optimal. Thus, a new generation of analogous compounds (collectively referred as rapalogs) with improved solubility, stability and bioavailability compared to rapamycin have emerged. Such compound include the following: everolimus (RAD001, Novartis), temsirolimus (CCI-779, Wyeth), deforolimus (AP23573, Ariad), and zotarolimus (ABT-578, Abbot Laboratories) (Fig. 3B). In the USA, everolimus and temsirolimus are approved for the treatment of advanced renal cell carcinoma. Everolimus is also FDA-approved for the treatment of subependymal giant cell astrocytoma associated with tuberous sclerosis and for pancreatic neuroendocrine tumors. Deforolimus and zotarolimus are currently being tested in a number of clinical trials for cancer treatment.

The chemical characteristics and biological effects of rapamycin and rapalogs have been extensively reviewed elsewhere [82, 83] and are not further discussed here.

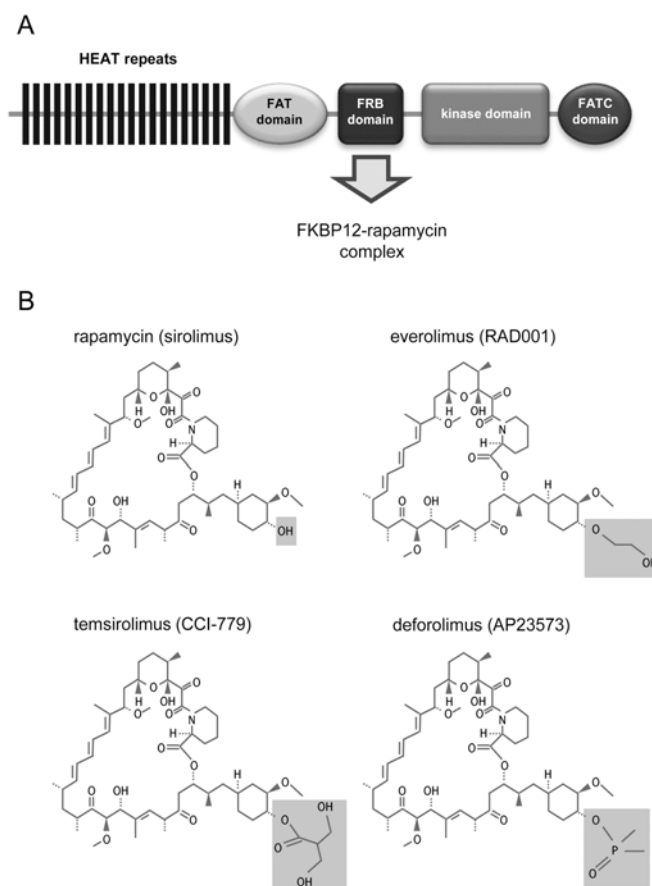


Fig. (3). mTOR protein and inhibitors. (A) Structure of the mTOR protein showing the HEAT repeats, FAT, FRB, kinase and FATC domains. The HEAT repeats are a protein-protein interaction motif. FAT and FATC domains modulate the kinase activity of mTOR. The inhibitory complex formed by rapamycin and FKBP12 interacts with the FRB domain. (B) Chemical structure of rapamycin and the most common rapalogs. Differences between rapamycin (sirolimus), everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), and deforolimus (AP23573) are highlighted.

THE POTENTIAL OF RAPAMYCIN/RAPALOGS TO IMPROVE COGNITIVE FUNCTION IN DOWN'S SYNDROME

mTOR hyperactivation has been reported in mouse models of fragile-X [32, 33] and tuberous sclerosis [34], two disorders linked to intellectual disability. At least in the case of tuberous sclerosis, rapamycin has been shown to restore impaired LTP and spatial learning [34]. Moreover, a clinical trial aimed to test the effect of everolimus on neurocognition in tuberous sclerosis patients is underway (<http://clinicaltrials.gov>, id. NCT01289912).

Inspired by these precedents, the use of rapamycin/rapalogs for treating Down's syndrome-associated cognitive dysfunction is intriguing, although a preclinical validation of efficacy is necessary. As a proof of concept, we have demonstrated that rapamycin restores the dendritic level of mTOR phosphorylation and reduces the rate of local dendritic translation in the hippocampus of Ts1Cje mice. Moreover, the increased dendritic level of the AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) receptor subunit GluR1 in the Ts1Cje neurons is also

normalized by rapamycin treatment [4]. It must be emphasized that *GluRI* is known to be locally translated in response to BDNF and is regulated by mTOR activity [29, 84]. We are currently testing the effect of rapamycin on memory and learning in Ts1Cje mice using classical behavioral tests.

When considering rapamycin/rapalogs for the putative treatment of DS, the most obvious advantages of these compounds are the following: 1) they are highly specific because the FRB domain of mTOR is unique [83], and 2) they are FDA-approved drugs. Nevertheless, other important issues should be considered. First, the mTOR pathway is subject to complex regulation, and the rapamycin effects seem to be highly dependent on the dose and time of treatment, as well as on the cell type. For example, prolonged treatment can interfere with mTORC2 assembly and, consequently, affect Akt signaling. In mice, a daily intraperitoneal injection of rapamycin for a week either hyper- or hypoactivates Akt, depending on the tissue. Nevertheless, this treatment did not affect the levels of phosphorylated Akt in the brain [14], suggesting that neuronal cells are not subjected to this regulatory phenomenon. It has also been shown that, whereas acute rapamycin treatment (1 h) initially induces 4E-BP1 and p70S6K dephosphorylation, prolonged treatment (24-48 h) causes the phosphorylation of 4E-BP1, but not of p70S6K, in a cell type-dependent manner [85]. Finally, in cancer cell lines, it has been shown that a low dose of rapamycin induces the phosphorylation of Akt and ERK by an mTORC1-dependent mechanism, whereas a high dose of rapamycin inhibits Akt and ERK phosphorylation through an mTORC2-dependent mechanism [86]. Considering this complex scenario, the long-term effects of rapamycin on Akt-mTOR signaling in DS neurons are unpredictable and should therefore be tested. Second, mTOR is involved in many functions unrelated to cognition, and the consequence of mTOR inhibition in non-neuronal tissues could have undesirable effects. Third, rapamycin increases the risks of developing infections and lymphoma. This finding is particularly noteworthy in the case of DS because patients with trisomy 21 show a number of mild immune defects, including a reduction in lymphocyte counts, an increased risk of developing autoimmune diseases and a higher susceptibility to suffer infections, especially those affecting the respiratory tract [87]. Other rapamycin-associated adverse reactions, including peripheral edema, hypertriglyceridemia, hypertension, hypercholesterolemia, anemia and thrombocytopenia, should be carefully considered in the specific context of DS.

FUTURE DIRECTIONS

The identification of the altered molecular pathways common to different intellectual disabilities is an exciting finding that could lead to synergical advances in the search for new therapies to improve cognition in these diseases. When considering the intellectual disabilities that are linked to dysfunctional Akt-mTOR signaling, DS presents the most complex scenario. Fragile X, tuberous sclerosis and Rett's syndrome are caused by the loss-of-function of a single gene. In contrast, hundreds of genes are triplicated in DS. Interestingly, mTOR hyperactivation interferes with different

aspects of synaptic transmission. As mentioned above, hyperactive mTOR signaling enhances GABAergic and glutamatergic transmission at the presynaptic level [80], while at the postsynaptic level, it increases local translation [4, 33] and interferes with some types of synaptic plasticity. In conclusion, mTOR hyperactivation could lead to unbalanced glutamatergic/GABAergic signaling in DS. The resulting synaptic plasticity phenotype would likely be dependent on the brain region. Due to this complex regulation, the potential of rapamycin/rapalogs alone or in combination with other drugs to improve cognition in DS is an open question that should be investigated. Pre-clinical trials to test whether rapamycin restores synaptic plasticity, memory and learning in Ts1Cje mice are underway.

ABBREVIATIONS

4E-BP	= eIF4E-binding protein
AMPA	= α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid
BDNF	= Brain-Derived Neurotrophic Factor
DS	= Down's syndrome
DSCR	= Down Syndrome Critical Region
FDA	= Food and Drug Administration
GABA	= γ -aminobutyric acid
L-LTP	= Late long-term potentiation
LTD	= Long-term depression
mGlu	= Metabotropic glutamate
mGluR	= Metabotropic glutamate receptor
NMDA	= N-Methyl-D-Aspartate
NMDAR	= NMDA receptor
p70S6K	= S6 kinase

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that they do not have any conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Francisco J. Tejedor for critically reading the manuscript. This work was supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (Instituto de Salud Carlos III, Spain; grant PII10507), the Junta de Andalucía (grant P09-CTS-4610) and the Fondation Jérôme Lejeune (France) to MLM.

REFERENCES

- [1] Dazert, E.; Hall, M.N. mTOR signaling in disease. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **2011**, *23*(6), 744-755.
- [2] Troca-Marin, J.A.; Alves-Sampaio, A.; Montesinos, M.L. Deregulated mTOR-mediated translation in intellectual disability. *Prog. Neurobiol.*, **2012**, *96*(2), 268-282.
- [3] Menon, S.; Manning, B.D. Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene*, **2008**, *27*(Suppl 2), S43-S51.
- [4] Troca-Marin, J.A.; Alves-Sampaio, A.; Montesinos, M.L. 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), 9445-9455.
- [5] Hoeffler, C.A.; Klann, E. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci.*, **2010**, *33*(2), 67-75.
- [6] Lee, C.C.; Huang, C.C.; Hsu, K.S. Insulin promotes dendritic spine and synapse formation by the PI3K/Akt/mTOR and Rac1 signaling pathways. *Neuropharmacology*, **2011**, *61*(4), 867-879.
- [7] Hara, K.; Maruki, Y.; Long, X.; Yoshino, K.; Oshiro, N.; Hidayat, S.; Tokunaga, C.; Avruch, J.; Yonezawa, K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, **2002**, *110*(2), 177-189.
- [8] Kim, D.H.; Sarbassov, D.D.; Ali, S.M.; King, J.E.; Latek, R.R.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Sabatini, D.M. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, **2002**, *110*(2), 163-175.
- [9] Jacinto, E.; Loewith, R.; Schmidt, A.; Lin, S.; Ruegg, M.A.; Hall, A.; Hall, M.N. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.*, **2004**, *6*(11), 1122-1128.
- [10] Sarbassov, D.D.; Ali, S.M.; Kim, D.H.; Guertin, D.A.; Latek, R.R.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Sabatini, D.M. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.*, **2004**, *14*(14), 1296-1302.
- [11] Nojima, H.; Tokunaga, C.; Eguchi, S.; Oshiro, N.; Hidayat, S.; Yoshino, K.; Hara, K.; Tanaka, N.; Avruch, J.; Yonezawa, K. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*(18), 15461-15464.
- [12] Meyuhas, O. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur. J. Biochem.*, **2000**, *267*(21), 6321-6330.
- [13] Culjkovic, B.; Topisirovic, I.; Skrabanek, L.; Ruiz-Gutierrez, M.; Borden, K.L. eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR. *J. Cell Biol.*, **2005**, *169*(2), 245-256.
- [14] Sarbassov, D.D.; Ali, S.M.; Sengupta, S.; Sheen, J.H.; Hsu, P.P.; Bagley, A.F.; Markhard, A.L.; Sabatini, D.M. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell*, **2006**, *22*(2), 159-168.
- [15] Facchinetti, V.; Ouyang, W.; Wei, H.; Soto, N.; Lazorchak, A.; Gould, C.; Lowry, C.; Newton, A.C.; Mao, Y.; Miao, R.Q.; Sessa, W.C.; Qin, J.; Zhang, P.; Su, B.; Jacinto, E. The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J.*, **2008**, *27*(14), 1932-1943.
- [16] Kumar, V.; Zhang, M.X.; Swank, M.W.; Kunz, J.; Wu, G.Y. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J. Neurosci.*, **2005**, *25*(49), 11288-11299.
- [17] Jaworski, J.; Spangler, S.; Seeburg, D.P.; Hoogenraad, C.C.; Sheng, M. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J. Neurosci.*, **2005**, *25*(49), 11300-11312.
- [18] Jossin, Y.; Goffinet, A.M. Reelin signals through phosphatidylinositol 3-kinase and Akt to control cortical development and through mTOR to regulate dendritic growth. *Mol. Cell Biol.*, **2007**, *27*(20), 7113-7124.
- [19] Chow, D.K.; Groszer, M.; Pribadi, M.; Machnicki, M.; Carmichael, S.T.; Liu, X.; Trachtenberg, J.T. Laminar and compartmental regulation of dendritic growth in mature cortex. *Nat. Neurosci.*, **2009**, *12*(2), 116-118.
- [20] Tang, S.J.; Reis, G.; Kang, H.; Gingras, A.C.; Sonenberg, N.; Schuman, E.M. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*(1), 467-472.
- [21] Cammalleri, M.; Lutjens, R.A.; Berton, F.; King, A.R.; Simpson, C.; Francesconi, W.; Sanna, P.P. Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*(24), 14368-14373.
- [22] 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), 6352-6361.
- [23] Parsons, R.G.; Gafford, G.M.; Helmstetter, F.J. Translational control via the mammalian target of rapamycin pathway is critical for the formation and stability of long-term fear memory in amygdala neurons. *J. Neurosci.*, **2006**, *26*(50), 12977-12983.
- [24] Stoica, L.; Zhu, P.J.; Huang, W.; Zhou, H.; Kozma, S.C.; Costa-Mattioli, M. Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2011**, *108*(9), 3791-3796.
- [25] Tsokas, P.; Grace, E.A.; Chan, P.; Ma, T.; Sealfon, S.C.; Iyengar, R.; Landau, E.M.; Blitzer, R.D. Local protein synthesis mediates a rapid increase in dendritic elongation factor 1A after induction of late long-term potentiation. *J. Neurosci.*, **2005**, *25*(24), 5833-5843.
- [26] Vickers, C.A.; Dickson, K.S.; Wyllie, D.J. Induction and maintenance of late-phase long-term potentiation in isolated dendrites of rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J. Physiol.*, **2005**, *568*(Pt 3), 803-813.
- [27] Gong, R.; Park, C.S.; Abbassi, N.R.; Tang, S.J. Roles of glutamate receptors and the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in activity-dependent dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*(27), 18802-18815.
- [28] Bekinschtein, P.; Katche, C.; Slipczuk, L.N.; Igaz, L.M.; Cammarota, M.; Izquierdo, I.; Medina, J.H. mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **2007**, *87*(2), 303-307.
- [29] Slipczuk, L.; Bekinschtein, P.; Katche, C.; Cammarota, M.; Izquierdo, I.; Medina, J.H. BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *PLoS One*, **2009**, *4*(6), e6007.
- [30] Jobim, P.F.; Pedrosa, T.R.; Christoff, R.R.; Werenicz, A.; Maurmann, N.; Reolon, G.K.; Roesler, R. Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **2012**, *97*(1), 105-112.
- [31] Huber, K.M.; Kayser, M.S.; Bear, M.F. Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science*, **2000**, *288*(5469), 1254-1257.
- [32] Sharma, A.; Hoeffler, C.A.; Takayasu, Y.; Miyawaki, T.; McBride, S.M.; Klann, E.; Zukin, R.S. Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. *J. Neurosci.*, **2010**, *30*(2), 694-702.
- [33] Gross, C.; Nakamoto, M.; Yao, X.; Chan, C.B.; Yim, S.Y.; Ye, K.; Warren, S.T.; Bassell, G.J. Excess phosphoinositide 3-kinase subunit synthesis and activity as a novel therapeutic target in fragile X syndrome. *J. Neurosci.*, **2010**, *30*(32), 10624-10638.
- [34] Ehninger, D.; Han, S.; Shilyansky, C.; Zhou, Y.; Li, W.; Kwiatkowski, D.J.; Ramesh, V.; Silva, A.J. Reversal of learning deficits in a Tsc2^{+/−} mouse model of tuberous sclerosis. *Nat. Med.*, **2008**, *14*(8), 843-848.
- [35] Ricciardi, S.; Boggio, E.M.; Grosso, S.; Lonetti, G.; Forlani, G.; Stefanelli, G.; Calcagno, E.; Morello, N.; Landsberger, N.; Biffo, S.; Pizzorusso, T.; Giustetto, M.; Broccoli, V. Reduced AKT/mTOR signaling and protein synthesis dysregulation in a Rett syndrome animal model. *Hum. Mol. Genet.*, **2011**, *20*(6), 1182-1196.
- [36] Sago, H.; Carlson, E.J.; Smith, D.J.; Kilbridge, J.; Rubin, E.M.; Mobley, W.C.; Epstein, C.J.; Huang, T.T. Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*(11), 6256-6261.
- [37] Delabar, J.M.; Theophile, D.; Rahmani, Z.; Chettouh, Z.; Blouin, J.L.; Prieur, M.; Noel, B.; Sinet, P.M. Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur. J. Hum. Genet.*, **1993**, *1*(2), 114-124.
- [38] Korenberg, J.R.; Chen, X.N.; Schipper, R.; Sun, Z.; Gonsky, R.; Gerwehr, S.; Carpenter, N.; Daumer, C.; Dignan, P.; Disteche, C.; et al. Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*(11), 4997-5001.
- [39] Belichenko, N.P.; Belichenko, P.V.; Kleschevnikov, A.M.; Salehi, A.; Reeves, R.H.; Mobley, W.C. The "Down syndrome critical region" is sufficient in the mouse model to confer behavioral, neurophysiological, and synaptic phenotypes characteristic of Down syndrome. *J. Neurosci.*, **2009**, *29*(18), 5938-5948.
- [40] Contestabile, A.; Benfenati, F.; Gasparini, L. Communication breaks-Down: from neurodevelopment defects to cognitive disabilities in Down syndrome. *Prog. Neurobiol.*, **2010**, *91*(1), 1-22.

- [41] Belichenko, P.V.; Kleschevnikov, A.M.; Salehi, A.; Epstein, C.J.; Mobley, W.C. Synaptic and cognitive abnormalities in mouse models of Down syndrome: exploring genotype-phenotype relationships. *J. Comp. Neurol.*, **2007**, *504*(4), 329-345.
- [42] Siarey, R.J.; Villar, A.J.; Epstein, C.J.; Galdzicki, Z. Abnormal synaptic plasticity in the Ts1Cje segmental trisomy 16 mouse model of Down syndrome. *Neuropharmacology*, **2005**, *49*(1), 122-128.
- [43] Sago, H.; Carlson, E.J.; Smith, D.J.; Rubin, E.M.; Crnic, L.S.; Huang, T.T.; Epstein, C.J. Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome. *Pediatr. Res.*, **2000**, *48*(5), 606-613.
- [44] Olson, L.E.; Roper, R.J.; Baxter, L.L.; Carlson, E.J.; Epstein, C.J.; Reeves, R.H. Down syndrome mouse models Ts65Dn, Ts1Cje, and Ms1Cje/Ts65Dn exhibit variable severity of cerebellar phenotypes. *Dev. Dyn.*, **2004**, *230*(3), 581-589.
- [45] Moldrich, R.X.; Dauphinot, L.; Laffaire, J.; Vitalis, T.; Herault, Y.; Beart, P.M.; Rossier, J.; Vivien, D.; Gehrig, C.; Antonarakis, S.E.; Lyle, R.; Potier, M.C. Proliferation deficits and gene expression dysregulation in Down's syndrome (Ts1Cje) neural progenitor cells cultured from neurospheres. *J. Neurosci. Res.*, **2009**, *87*(14), 3143-3152.
- [46] Hewitt, C.A.; Ling, K.H.; Merson, T.D.; Simpson, K.M.; Ritchie, M.E.; King, S.L.; Pritchard, M.A.; Smyth, G.K.; Thomas, T.; Scott, H.S.; Voss, A.K. Gene network disruptions and neurogenesis defects in the adult Ts1Cje mouse model of Down syndrome. *PLoS One*, **2010**, *5*(7), e11561.
- [47] Ishihara, K.; Amano, K.; Takaki, E.; Shimohata, A.; Sago, H.; Epstein, C.J.; Yamakawa, K. Enlarged brain ventricles and impaired neurogenesis in the Ts1Cje and Ts2Cje mouse models of Down syndrome. *Cereb. Cortex*, **2010**, *20*(5), 1131-1143.
- [48] Richtsmeier, J.T.; Zumwalt, A.; Carlson, E.J.; Epstein, C.J.; Reeves, R.H. Craniofacial phenotypes in segmentally trisomic mouse models for Down syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, **2002**, *107*(4), 317-324.
- [49] Takei, N.; Inamura, N.; Kawamura, M.; Namba, H.; Hara, K.; Yonezawa, K.; Nawa, H. Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *J. Neurosci.*, **2004**, *24*(44), 9760-9769.
- [50] Tanaka, J.; Horiike, Y.; Matsuzaki, M.; Miyazaki, T.; Ellis-Davies, G.C.; Kasai, H. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science*, **2008**, *319*(5870), 1683-1687.
- [51] Alves-Sampaio, A.; Troca-Marin, J.A.; Montesinos, M.L. NMDA-mediated regulation of DSCAM dendritic local translation is lost in a mouse model of Down's syndrome. *J. Neurosci.*, **2010**, *30*(40), 13537-13548.
- [52] Tongiorgi, E. Activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor in dendrites: facts and open questions. *Neurosci. Res.*, **2008**, *61*(4), 335-346.
- [53] Jovanovic, J.N.; Czernik, A.J.; Fienberg, A.A.; Greengard, P.; Sihra, T.S. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat. Neurosci.*, **2000**, *3*(4), 323-329.
- [54] Lessmann, V.; Gottmann, K.; Heumann, R. BDNF and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones. *Neuroreport*, **1994**, *6*(1), 21-25.
- [55] Suen, P.C.; Wu, K.; Levine, E.S.; Mount, H.T.; Xu, J.L.; Lin, S.Y.; Black, I.B. Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances phosphorylation of the postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*(15), 8191-8195.
- [56] Jarvis, C.R.; Xiong, Z.G.; Plant, J.R.; Churchill, D.; Lu, W.Y.; MacVicar, B.A.; MacDonald, J.F. Neurotrophin modulation of NMDA receptors in cultured murine and isolated rat neurons. *J. Neurophysiol.*, **1997**, *78*(5), 2363-2371.
- [57] Lin, S.Y.; Wu, K.; Levine, E.S.; Mount, H.T.; Suen, P.C.; Black, I.B. BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **1998**, *55*(1), 20-27.
- [58] Levine, E.S.; Crozier, R.A.; Black, I.B.; Plummer, M.R. Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*(17), 10235-10239.
- [59] Dogliotti, G.; Galliera, E.; Licastro, F.; Corsi, M.M. Age-related changes in plasma levels of BDNF in Down syndrome patients. *Immun. Ageing*, **2010**, *7*, 2.
- [60] Tili, A.; Hoischen, A.; Ripoll, C.; Benabou, E.; Badel, A.; Ronan, A.; Touraine, R.; Grattau, Y.; Stora, S.; van Bon, B.; de Vries, B.; Menten, B.; Bockaert, N.; Gecz, J.; Antonarakis, S.E.; Campion, D.; Potier, M.C.; Blehaut, H.; Delabar, J.M.; Janel, N. BDNF and DYRK1A Are Variable and Inversely Correlated in Lymphoblastoid Cell Lines from Down Syndrome Patients. *Mol. Neurobiol.*, **2012**, *46*(2), 297-303.
- [61] Teixeira, A.L.; Barbosa, I.G.; Diniz, B.S.; Kummer, A. Circulating levels of brain-derived neurotrophic factor: correlation with mood, cognition and motor function. *Biomark. Med.*, **2010**, *4*(6), 871-887.
- [62] Klein, A.B.; Williamson, R.; Santini, M.A.; Clemmensen, C.; Ettrup, A.; Rios, M.; Knudsen, G.M.; Aznar, S. Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **2011**, *14*(3), 347-353.
- [63] Siarey, R.J.; Kline-Burgess, A.; Cho, M.; Balbo, A.; Best, T.K.; Harashima, C.; Klann, E.; Galdzicki, Z. Altered signaling pathways underlying abnormal hippocampal synaptic plasticity in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J. Neurochem.*, **2006**, *98*(4), 1266-1277.
- [64] Siddiqui, A.; Lacroix, T.; Stasko, M.R.; Scott-McKean, J.J.; Costa, A.C.; Gardiner, K.J. Molecular responses of the Ts65Dn and Ts1Cje mouse models of Down syndrome to MK-801. *Genes Brain Behav.*, **2008**, *7*(7), 810-820.
- [65] Bimonte-Nelson, H.A.; Hunter, C.L.; Nelson, M.E.; Granholm, A.C. Frontal cortex BDNF levels correlate with working memory in an animal model of Down syndrome. *Behav. Brain Res.*, **2003**, *139*(1-2), 47-57.
- [66] Seo, H.; Isacson, O. Abnormal APP, cholinergic and cognitive function in Ts65Dn Down's model mice. *Exp. Neurol.*, **2005**, *193*(2), 469-480.
- [67] Peng, S.; Garzon, D.J.; Marchese, M.; Klein, W.; Ginsberg, S.D.; Francis, B.M.; Mount, H.T.; Mufson, E.J.; Salehi, A.; Fahnestock, M. Decreased brain-derived neurotrophic factor depends on amyloid aggregation state in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, **2009**, *29*(29), 9321-9329.
- [68] Fukuda, Y.; Berry, T.L.; Nelson, M.; Hunter, C.L.; Fukuhara, K.; Imai, H.; Ito, S.; Granholm-Bentley, A.C.; Kaplan, A.P.; Mutoh, T. Stimulated neuronal expression of brain-derived neurotrophic factor by Neurotrophin. *Mol. Cell Neurosci.*, **2010**, *45*(3), 226-233.
- [69] Bianchi, P.; Ciani, E.; Guidi, S.; Trazzi, S.; Felice, D.; Grossi, G.; Fernandez, M.; Giuliani, A.; Calza, L.; Bartesaghi, R. Early pharmacotherapy restores neurogenesis and cognitive performance in the Ts65Dn mouse model for Down syndrome. *J. Neurosci.*, **2010**, *30*(26), 8769-8779.
- [70] Lockrow, J.; Boger, H.; Bimonte-Nelson, H.; Granholm, A.C. Effects of long-term memantine on memory and neuropathology in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behav. Brain Res.*, **2011**, *221*(2), 610-622.
- [71] Kleschevnikov, A.M.; Belichenko, P.V.; Faizi, M.; Jacobs, L.F.; Htun, K.; Shamloo, M.; Mobley, W.C. Deficits in cognition and synaptic plasticity in a mouse model of Down syndrome ameliorated by GABAB receptor antagonists. *J. Neurosci.*, **2012**, *32*(27), 9217-9227.
- [72] Costa, A.C.; Scott-McKean, J.J.; Stasko, M.R. Acute injections of the NMDA receptor antagonist memantine rescue performance deficits of the Ts65Dn mouse model of Down syndrome on a fear conditioning test. *Neuropsychopharmacology*, **2008**, *33*(7), 1624-1632.
- [73] Altafaj, X.; Ortiz-Abalia, J.; Fernandez, M.; Potier, M.C.; Laffaire, J.; Andreu, N.; Dierssen, M.; Gonzalez-Garcia, C.; Cena, V.; Marti, E.; Fillat, C. Increased NR2A expression and prolonged decay of NMDA-induced calcium transient in cerebellum of TgDyrk1A mice, a mouse model of Down syndrome. *Neurobiol. Dis.*, **2008**, *32*(3), 377-384.
- [74] Lieberman, D.N.; Mody, I. Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca(2+)-dependent phosphatase. *Nature*, **1994**, *369*(6477), 235-239.
- [75] Panja, D.; Dageyte, G.; Bidinosti, M.; Wibrand, K.; Kristiansen, A.M.; Sonenberg, N.; Bramham, C.R. Novel translational control in Arc-dependent long term potentiation consolidation *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*(46), 31498-31511.
- [76] Kleschevnikov, A.M.; Belichenko, P.V.; Villar, A.J.; Epstein, C.J.; Malenka, R.C.; Mobley, W.C. Hippocampal long-term potentiation

- suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome. *J. Neurosci.*, **2004**, *24*(37), 8153-8160.
- [77] Costa, A.C.; Grybko, M.J. 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), 317-322.
- [78] Siarey, R.J.; Stoll, J.; Rapoport, S.I.; Galdzicki, Z. Altered long-term potentiation in the young and old Ts65Dn mouse, a model for Down Syndrome. *Neuropharmacology*, **1997**, *36*(11-12), 1549-1554.
- [79] Siarey, R.J.; Carlson, E.J.; Epstein, C.J.; Balbo, A.; Rapoport, S.I.; Galdzicki, Z. Increased synaptic depression in the Ts65Dn mouse, a model for mental retardation in Down syndrome. *Neuropharmacology*, **1999**, *38*(12), 1917-1920.
- [80] Weston, M.C.; Chen, H.; Swann, J.W. Multiple roles for mammalian target of rapamycin signaling in both glutamatergic and GABAergic synaptic transmission. *J. Neurosci.*, **2012**, *32*(33), 11441-11452.
- [81] Oshiro, N.; Yoshino, K.; Hidayat, S.; Tokunaga, C.; Hara, K.; Eguchi, S.; Avruch, J.; Yonezawa, K. Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes Cells*, **2004**, *9*(4), 359-366.
- [82] Zhou, H.; Luo, Y.; Huang, S. Updates of mTOR inhibitors. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **2010**, *10*(7), 571-581.
- [83] Benjamin, D.; Colombi, M.; Moroni, C.; Hall, M.N. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2011**, *10*(11), 868-880.
- [84] Schrott, G.M.; Nigh, E.A.; Chen, W.G.; Hu, L.; Greenberg, M.E. BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *J. Neurosci.*, **2004**, *24*(33), 7366-7377.
- [85] Choo, A.Y.; Yoon, S.O.; Kim, S.G.; Roux, P.P.; Blenis, J. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, *105*(45), 17414-17419.
- [86] Chen, X.G.; Liu, F.; Song, X.F.; Wang, Z.H.; Dong, Z.Q.; Hu, Z.Q.; Lan, R.Z.; Guan, W.; Zhou, T.G.; Xu, X.M.; Lei, H.; Ye, Z.Q.; Peng, E.J.; Du, L.H.; Zhuang, Q.Y. Rapamycin regulates Akt and ERK phosphorylation through mTORC1 and mTORC2 signaling pathways. *Mol. Carcinog.*, **2010**, *49*(6), 603-610.
- [87] Ram, G.; Chinen, J. Infections and immunodeficiency in Down syndrome. *Clin. Exp. Immunol.*, **2011**, *164*(1), 9-16.

Received: October 22, 2012

Revised: March 25, 2013

Accepted: March 27, 2013



Rapamycin restores BDNF-LTP and the persistence of long-term memory in a model of Down's syndrome



Yuniesky Andrade-Talavera^{a,1}, Itziar Benito^{b,c,d,1}, Juan José Casañas^{b,c}, Antonio Rodríguez-Moreno^a, María Luz Montesinos^{b,c,*}

^a Laboratorio de Neurociencia Celular y Plasticidad, Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, Universidad Pablo de Olavide, E-41013 Sevilla, Spain

^b Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Universidad de Sevilla, E-41009, Sevilla, Spain

^c Instituto de Biomedicina de Sevilla, IBIS/Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

^d Servicio de Animalario, Hospital Universitario Virgen Macarena (HUVVM), E-41009, Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 May 2015

Revised 22 August 2015

Accepted 16 September 2015

Available online 24 September 2015

Keywords:

Barnes maze

BDNF-LTP

ERK

MTOR

Pharmacotherapy

Rapamycin

Synaptic plasticity

Trisomy 21

Ts1Cje

ABSTRACT

Down's syndrome (DS) is the most prevalent genetic intellectual disability. Memory deficits significantly contribute to the cognitive dysfunction in DS. Previously, we discovered that mTOR-dependent local translation, a pivotal process for some forms of synaptic plasticity, is deregulated in a DS mouse model. Here, we report that these mice exhibit deficits in both synaptic plasticity (i.e., BDNF-long term potentiation) and the persistence of spatial long-term memory. Interestingly, these deficits were fully reversible using rapamycin, a Food and Drug Administration-approved specific mTOR inhibitor; therefore, rapamycin may be a novel pharmacotherapy to improve cognition in DS.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Trisomy of human chromosome 21 leads to Down's syndrome (DS), the most frequent intellectual disability of genetic origin. Deficits in

spatial long-term memory (LTM) and retrieval of explicit memory are well documented in individuals with DS (Carlesimo et al., 1997; Pennington et al., 2003). These data suggest that both hippocampal and prefrontal dysfunction cooperate to produce cognitive disability.

Memory consolidation (i.e., conversion of short-term memory into LTM) requires the synthesis of new proteins that modify synapses both structurally and functionally. Some of these proteins are locally translated from pre-existent dendritic mRNAs. Thus, local translation is crucial for synaptic plasticity, learning and memory (reviewed by Buffington et al., 2014). We previously reported a deregulation of hippocampal local translation due to Akt–mammalian target of rapamycin (mTOR) hyperactivation in Ts1Cje mice, a DS model (Troca-Marin et al., 2011). This pathway is coupled to postsynaptic receptors, including the tropomyosin-related kinase B (TrkB) receptor, to regulate local translation rates and synaptic plasticity (Tang et al., 2002; Takei et al., 2004). In Ts1Cje mice, mTOR hyperactivation provokes abnormally augmented synaptic local translation due to increased brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/pro-BDNF levels (Troca-Marin et al., 2011), suggesting a saturation of the BDNF–TrkB–Akt–mTOR regulatory axis. Indeed, Ts1Cje synapses do not respond to exogenous BDNF (Troca-Marin et al., 2011), which could be relevant for impaired learning and memory in DS (Troca-Marin et al., 2014). Very recently, mTOR hyperactivation

Abbreviations: 4EBPs, eIF4E-binding proteins; AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CHX, cycloheximide; DG, dentate gyrus; DS, Down's syndrome; eIF4E, eukaryotic translation initiation factor 4E; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FDA, Food and Drug Administration; fEPSPs, field excitatory postsynaptic potentials; GABA, gamma-aminobutyric acid; HFS, high frequency stimulation; LTD, long-term depression; LTM, long-term memory; LTP, Long-term potentiation; MEK, MAPK/ERK kinase; Mnk1, mitogen-activated protein kinase integrating kinase 1; mTOR, mammalian target of rapamycin; NMDAR, N-methyl D-aspartate receptor; p70S6K, p70 S6 kinase; PDK1, phosphoinositide-dependent kinase 1; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PIP2, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PIP3, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate; PPF, paired-pulse facilitation; PPR, paired-pulse ratio; PTEN, Phosphatase and tensin homolog on chromosome ten; RSK, p90 ribosomal S6 kinase; TrkB, tropomyosin-related kinase B; TSC, tuberous sclerosis complex; WT, wild-type.

* Corresponding author at: Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Instituto de Biomedicina de Sevilla, Universidad de Sevilla, Av. Sánchez-Pizjuán 4, E-41009 Sevilla, Spain.

E-mail address: mlmontesinos@us.es (M.L. Montesinos).

¹ These authors contributed equally to this work.

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

was found in *post-mortem* DS brains (Iyer et al., 2014; Perluigi et al., 2014).

Interestingly, the Food and Drug Administration (FDA)-approved specific mTOR inhibitor rapamycin restores the local translation rates of Ts1Cje (Troca-Marin et al., 2011). This fact raises the possibility that rapamycin could have therapeutic potential for DS intellectual disability. Here, we show that CA3–CA1 BDNF-long term potentiation (BDNF-LTP), an mTOR-dependent form of synaptic plasticity, is lacking in Ts1Cje mice. Moreover, these mice show impaired persistence of spatial LTM. Importantly, rapamycin fully reverses both of these phenotypes.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Partially trisomic Ts1Cje mice (Sago et al., 1998) were obtained from Jackson Laboratories and maintained on a mixed genetic background as recommended by backcrossing Ts1Cje males to C57BL/6J^{OlaHsd} × C3H/HeN^{Hsd} F1 females. This mating system results in a similar proportion of wild-type (WT) and Ts1Cje animals. Sets of male WT and Ts1Cje littermates were used in the experiments, that were carried out according to the European Union directive (86/609/EU) for the use of laboratory animals and were approved by the local Ethical Committee.

For the electrophysiological recordings, post-natal day 21–30 male mice were used. For the behavioral experiments, male mice between 2 and 4 months of age were used; furthermore, blind animals homozygous for the retinal degeneration mutation *Pde6b*^{d1}, which segregates in the Ts1Cje colony (Sago et al., 1998), were not used.

2.2. Reagents

BDNF, cycloheximide, K252a and PD98059 were purchased from Sigma-Aldrich. Rapamycin was acquired from Selleck Chemicals and D-AP5 from Tocris Bioscience. For electrophysiological experiments, BDNF, cycloheximide and D-AP5 were directly dissolved in water; rapamycin, K252a and PD98059 stocks were prepared in DMSO (final concentration of DMSO in the perfusion solution 0.1% v/v). For behavioral experiments, rapamycin was prepared in a vehicle solution (saline buffer containing 4% ethanol, 5% Tween® 80 and 5% polyethylene glycol 400) as previously described (Kwon et al., 2003).

2.3. Electrophysiological recordings

Hippocampal slices were prepared as described elsewhere (Rodriguez-Moreno et al., 1998; Andrade-Talavera et al., 2012). The whole brain, including the two hippocampi, was removed in an ice-cold solution containing the following components (in mM): 124 NaCl, 2.69 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 2.0 MgSO₄, 1.8 CaCl₂, 26 NaHCO₃, and 10 glucose (pH 7.3, ~300 mOsm). Next, the brain was positioned on the stage of a vibratome slicer (Leica VT 1000S) and cut coronally to obtain 350 μm-thick transverse hippocampal slices. These slices were kept continuously oxygenated for ≥ 1 h before use. All of the experiments were carried out at room temperature (22–25 °C). The drugs were bath applied, switching between different perfusion lines at a ratio of 3 ml/min. The experiments performed in the presence of rapamycin, cycloheximide or K252a were carried out in slices treated with these compounds 30 min before BDNF application. In PD98059 experiments the slices were pre-incubated at least 1 h prior baseline recording. Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded in the CA1 region and were evoked at 0.2 Hz stimulation with a monopolar electrode placed on Schaffer collateral afferents in the *stratum radiatum*. The distance between the stimulating and recording electrodes was 200 μm. Extracellular recording electrodes were filled with an external solution. In paired-pulse experiments, two consecutive stimuli separated by 40 ms were applied. The basal synaptic transmission in wild-type, Ts1Cje and rapamycin-treated Ts1Cje slices were studied by a stimulus–

response curve, ranging from 0 to 240 μA with a 20 μA increase per step. The mean of six fEPSPs at each stimulation strength was calculated. The data were filtered at 2 kHz and acquired at 10 kHz.

2.4. Barnes maze test

The protocol used for the Barnes maze test was previously described in detail (Sunyer et al., 2007). Briefly, the mouse was first subjected to an adaptation period in which it was exposed to the stimulus (the air jets produced by three fans surrounding the Barnes platform) and guided to the target box by the experimenter. Next, the mouse was allowed to stay in the box for 2 min. After adaptation, the training phase consisted of 4 trials per day (15-min inter-trial interval) for 4 consecutive days. During each trial, the mouse was exposed to the stimulus and allowed to explore for 3 min. The animal was allowed to remain in the box for 1 min after entering the target hole. If the mouse did not find the target box, it was guided to the target hole by the experimenter. The primary latency (time spent to find the target box) was used to evaluate spatial acquisition (learning of the task).

Two probe trials were performed, including one at 24 h and one at 8 days after the training (Sunyer et al., 2007). During the probe trials, the target hole was closed, and the mouse was allowed to explore for 90 s. The time spent in the target quadrant, the time elapsed before exploring the virtual target box for the first time (primary latency) and the number of primary errors (exploration of wrong hole events before exploring the virtual target box for the first time) were used to assess LTM (24 h probe) and the persistence of LTM (8 day probe).

Visual cues were posted around the Barnes maze platform. To avoid olfactory cues, the maze was systematically cleaned with a surface disinfectant (1% CR36) after each trial and rotated around its axis. An automated tracking system (Smart, Harvard Apparatus) was used to monitor and analyze the animals behavior.

For wild-type or Ts1Cje rapamycin-treated mice, rapamycin (10 mg/kg) was administered by intraperitoneal injection during the 5 days prior to the Barnes maze test (one injection per day). The rapamycin was dissolved at 1 mg/ml in a vehicle solution as previously described (Kwon et al., 2003). A group of Ts1Cje mice were treated with vehicle solution following the same injection scheme. Untreated wild-type and Ts1Cje mice did not receive any kind of treatment or manipulation previous to the training phase.

2.5. Statistics

Data are presented as the mean ± SEM. For electrophysiological experiments, significance was assessed using Student's paired t-test. For statistical comparisons, an averaged and normalized slope of the last 5 min of the time course was taken over 60 min after BDNF application. This slope was represented as the mean value of BDNF-potentiation in each experimental condition. For behavioral experiments, data from the Barnes maze acquisition phase were analyzed using a repeated-measured two-way ANOVA with the Bonferroni post-hoc test. To compare the performance at the 24 h probe and the 8 day probe, data were analyzed using Student's paired t-test. A one-sample t-test was used to assess if the mean values obtained in experiments were significantly different from specified values (target quadrant occupancy different from 25% or scores different from 0). The significance level is indicated using asterisks: **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001.

3. Results

3.1. CA3–CA1 BDNF-LTP is absent in Ts1Cje mice, and it is restored by rapamycin

Synaptic plasticity deficits were previously reported for Ts1Cje mice, including reduced LTP and increased long-term depression (LTD) in the hippocampal CA1 region (Siarey et al., 2005) and decreased dentate–

gyrus (DG) LTP (Belichenko et al., 2007). However, CA3–CA1 BDNF-LTP, a type of synaptic plasticity that requires local dendritic translation (Kang and Schuman, 1996) and depends on mTOR activation (Tang et al., 2002), has not been investigated in a DS mouse model. We previously demonstrated that mTOR-driven local translation is deregulated in the Ts1Cje hippocampus (Troca-Marin et al., 2011); therefore, we first analyzed BDNF-LTP in these mice.

We found that exogenous BDNF application (20 ng/ml) induced a robust synaptic potentiation at CA3–CA1 synapses in wild-type hippocampal slices ($166 \pm 17\%$ of baseline, $n = 9$), as previously shown by Tang et al. (2002). However, BDNF-potentiation was absent in the Ts1Cje hippocampus ($110 \pm 8\%$ of baseline, $n = 15$) (Fig. 1A, C). As expected (Tang et al., 2002), rapamycin (200 nM) abolished BDNF-LTP in the wild-type hippocampal slices ($109 \pm 10\%$ of baseline, $n = 11$), but it remarkably restored this form of plasticity in the Ts1Cje hippocampus ($194 \pm 23\%$ of baseline, $n = 10$) (Fig. 1B, C). This recovery effect was significantly reduced in the presence of $10 \mu\text{M}$ cycloheximide (CHX) (CHX: $115 \pm 15\%$ of baseline, $n = 7$ versus control: $216 \pm 24\%$ of baseline, $n = 5$; Fig. 1E, F) demonstrating that, similarly to BDNF-LTP in the wild-type (Kang and Schuman, 1996) (CHX: $109 \pm 8\%$ of baseline, $n = 7$ versus control: $157 \pm 7\%$ of baseline, $n = 4$; Fig. 1D, F), it depends on protein translation. Also similarly to BDNF-LTP in the wild-type (Kang and Schuman, 1995), rapamycin-recovered potentiation in Ts1Cje was prevented in the presence of K252a, an inhibitor of

the tyrosine protein kinase activity of TrkB receptors (K252a: $95 \pm 3\%$ of baseline, $n = 7$ versus control: $211 \pm 26\%$ of baseline, $n = 5$; Fig. 2). These data show that rapamycin-restored BDNF-LTP in Ts1Cje mice requires the activation of TrkB receptors.

It is also known that, in addition to mTOR, BDNF signaling through TrkB receptors activates the Ras–ERK (Extracellular signal-regulated kinase) pathway, which enhances synaptic translational rates and participates in different forms of plasticity (reviewed by Panja and Bramham, 2014). However, it is unknown whether the Ras–ERK pathway plays a role on CA3–CA1 BDNF-LTP.

To gain more insight into the mechanisms of the BDNF-LTP observed in wild-type and rapamycin-treated Ts1Cje animals, we checked a possible contribution of ERK signaling in these experimental groups. We performed experiments in the presence of PD98059, a MEK (MAPK/ERK kinase) specific inhibitor. In wild-type mice slices, BDNF-LTP was almost completely prevented in the presence of $50 \mu\text{M}$ of PD98059 ($121 \pm 12\%$ of baseline, $n = 6$ versus control: $160 \pm 9\%$ of baseline, $n = 9$; Fig. 3A, B). Ts1Cje hippocampal slices treated with $50 \mu\text{M}$ of PD98059 did not show potentiation in the presence of 200 nM rapamycin after BDNF application (PD98059: $93 \pm 13\%$ of baseline, $n = 6$ versus control: $178 \pm 18\%$ of baseline, $n = 9$; Fig. 3C, D) demonstrating that, similarly to BDNF-LTP in the wild-type, it involves ERK signaling.

Glutamatergic synapses are known to exhibit mechanistically different types of plasticity, and N-methyl D-aspartate receptors (NMDAR)

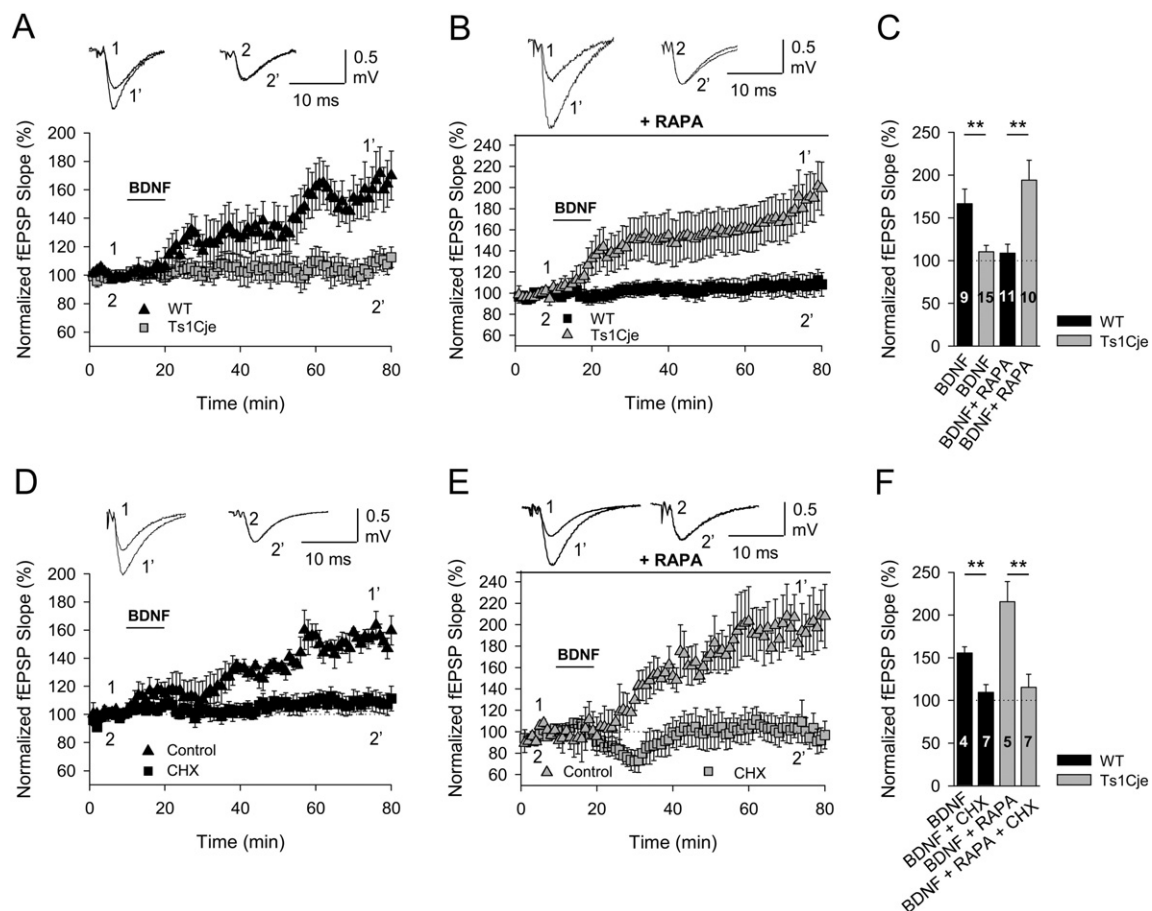


Fig. 1. BDNF-induced LTP at CA3–CA1 hippocampal synapses in WT and Ts1Cje slices treated with or without rapamycin. (A) Time course of BDNF (20 ng/ml) effects on field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) in WT and Ts1Cje mice. Inset: representative traces of a fEPSP before (1) and after (1') BDNF application in WT mice and before (2) and after (2') BDNF application in Ts1Cje mice. (B) Time course of BDNF (20 ng/ml) effects on fEPSPs in slices from WT and Ts1Cje mice treated with rapamycin (200 nM). Inset: representative traces of a fEPSP before (2) and after (2') BDNF application in WT mice and before (1) and after (1') BDNF application in Ts1Cje mice. (C) Quantification of the effects depicted in panels A and B. (D) Time course of BDNF (20 ng/ml) effects on fEPSPs in WT slices under control conditions and in slices treated with $10 \mu\text{M}$ cycloheximide. Inset: representative traces of a fEPSP before (1) and after (1') BDNF application under control conditions, and before (2) and after (2') BDNF application in slices treated with $10 \mu\text{M}$ cycloheximide. (E) Time course of BDNF-induced potentiation in Ts1Cje slices treated with 200 nM rapamycin in control conditions and in the presence of $10 \mu\text{M}$ cycloheximide. Inset: representative traces of a fEPSP before (1) and after (1') BDNF application in the absence of $10 \mu\text{M}$ cycloheximide, and before (2) and after (2') BDNF application in slices treated with the translation inhibitor. (F) Summary of the results shown in panels D and E. The error bars represent the SEM. The number of slices for each condition is indicated in the corresponding bar. ** $p < 0.01$, Student's t-test.

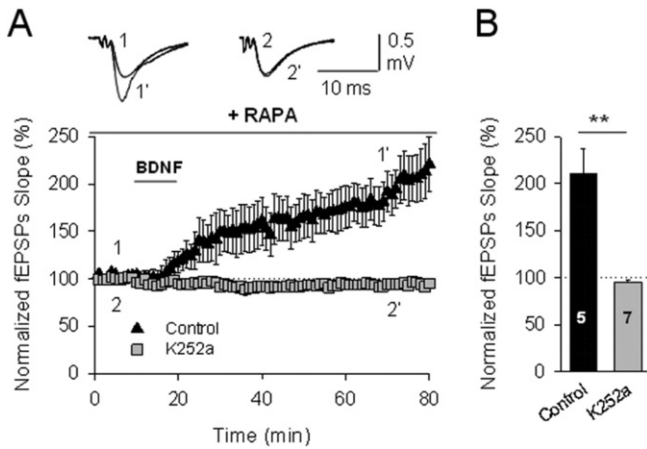


Fig. 2. The effect of the TrkB receptor inhibitor K252a on rapamycin-induced restoration of BDNF-induced LTP at CA3–CA1 hippocampal synapses in Ts1Cje mice. (A) Time course of BDNF-induced potentiation in Ts1Cje slices treated with 200 nM rapamycin in control conditions and in the presence of 200 nM K252a. Inset: representative traces of a fEPSP before (1) and after (1') BDNF application in the absence of 200 nM K252a, and before (2) and after (2') BDNF application in slices treated with the TrkB receptor inhibitor. (B) Summary of the results shown in panel A. The error bars represent the SEM. The number of slices for each condition is indicated in the corresponding bar. ** $P < 0.01$, Student's t-test.

are widely involved in them. In particular, NMDAR activation can trigger the Ras–ERK pathway (reviewed by Thomas and Huganir, 2004). Thus, we decided to determine whether NMDARs were involved in the rapamycin-restored BDNF-LTP observed in trisomic animals.

In Ts1Cje slices, the rapamycin-recovered BDNF-LTP was not prevented in the presence of the NMDAR antagonist D-AP5 (50 μ M D-AP5: $193 \pm 26\%$ of baseline, $n = 4$ versus control: $178 \pm 18\%$ of baseline, $n = 9$; Fig. 3C, D), indicating that NMDARs are not required for this form of LTP. Similar results were obtained in wild-type slices (50 μ M D-AP5: $179 \pm 26\%$ of baseline, $n = 5$ versus control: $160 \pm 9\%$ of baseline, $n = 9$; Fig. 3A, B), as previously reported (Kang and Schuman, 1995).

The paired-pulse ratio (PPR) at CA3–CA1 synapses did not change after BDNF application in WT or Ts1Cje slices, regardless of the presence or absence of rapamycin (Fig. 4A, B). These results suggest a postsynaptic mechanism for BDNF-induced potentiation both in WT and rapamycin-treated Ts1Cje slices.

Interestingly, Ts1Cje CA3–CA1 synapses did not show facilitation in response to the paired-pulse protocol (Fig. 4A). Moreover, a clear basal synaptic transmission difference was observed between Ts1Cje and WT mice hippocampal CA3–CA1 synapses (Fig. 4C, D). Remarkably, rapamycin application restored the basal synaptic transmission deficit (Fig. 4C, D) and paired-pulse facilitation (PPF) (Fig. 4B), even in the presence of CHX, K252a or PD98059 (Supplementary Fig. 1), showing that this recovery effect is independent of protein synthesis, TrkB and ERK signaling.

Overall, these experiments are the first to show the impairment of Schaffer collateral-CA1 BDNF-LTP in a DS mouse model. Importantly, we found that the mTOR antagonist rapamycin completely rescues this plasticity deficit. Moreover, rapamycin also restores basal synaptic transmission and short-term plasticity in this DS mouse model.

3.2. The persistence of spatial LTM is impaired in Ts1Cje mice, and it is restored by rapamycin

In addition to its role in hippocampal plasticity (Korte et al., 1995; Kang and Schuman, 1996; Patterson et al., 1996), BDNF is essential for hippocampal-mediated learning and memory (Linnarsson et al., 1997; Mizuno et al., 2000) and for persistence of LTM storage (Bekinschtein et al., 2007). Ts1Cje mice show reduced performance on two hippocampal-dependent memory tests, the Morris maze (Sago et al.,

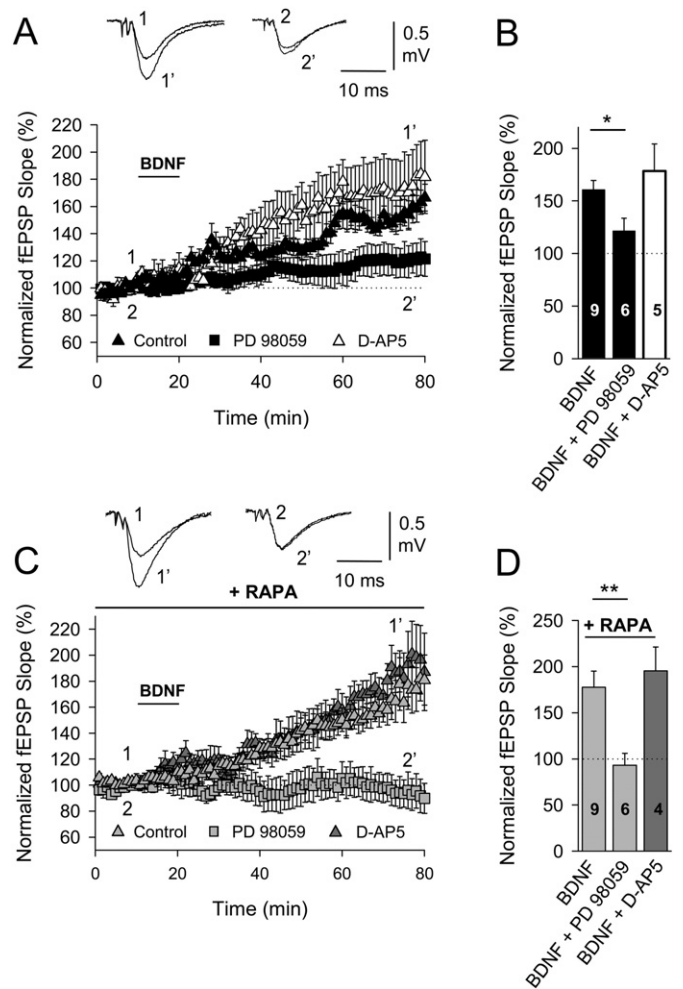


Fig. 3. BDNF-LTP in the CA1 region of the hippocampus involves ERK signaling but not NMDA receptor activation. (A) Time course of the BDNF effect on fEPSP slopes in control conditions (dark triangles), in the presence of 50 μ M PD98059 (dark squares) and in the presence of 50 μ M D-AP5 (open triangles) in WT mice slices. Inset: representative traces of a fEPSP before (1) and after (1') BDNF application in the presence of 50 μ M D-AP5, and before (2) and after (2') BDNF application in slices treated with 50 μ M PD98059. (B) Summary of results shown in panel A. (C) Time course of the BDNF effect on fEPSP slopes in Ts1Cje slices treated with 200 nM rapamycin in control conditions (gray triangles), in the presence of 50 μ M PD98059 (gray squares) and in the presence of 50 μ M D-AP5 (dark triangles). Inset: representative traces of a fEPSP before (1) and after (1') BDNF application in the presence of 50 μ M D-AP5, and before (2) and after (2') BDNF application in slices treated with 50 μ M PD98059. (D) Summary of results shown in panel C. The error bars represent the SEM. The number of slices for each condition is indicated in the corresponding bar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Student's t-test.

1998) and the T-maze spontaneous alternation task (Belichenko et al., 2007).

Thus, we assessed if rapamycin was able to improve the performance of Ts1Cje mice in a hippocampal-dependent memory test. Given that strong aversive stimuli normally used for reinforcement (such as water in the Morris maze) have been reported to affect animal performance (Hölscher, 1999), we chose the Barnes maze because it is a spatial task similar to the Morris water maze but less stressful for mice (Sunyer et al., 2007). In the Barnes maze, the mouse is placed in a circular, dry platform and is exposed to a weak aversive stimulus (here, a jet air) to induce escape into a target box located under one of 20 holes that are positioned around the perimeter of the platform (Sunyer et al., 2007).

We established four experimental groups: untreated wild-type (WT) and Ts1Cje animals and Ts1Cje mice treated with either vehicle (Ts1Cje vehicle) or 10 mg/kg rapamycin (Ts1Cje RAPA) for the 5 days prior to the training phase (1 intraperitoneal injection per day). We

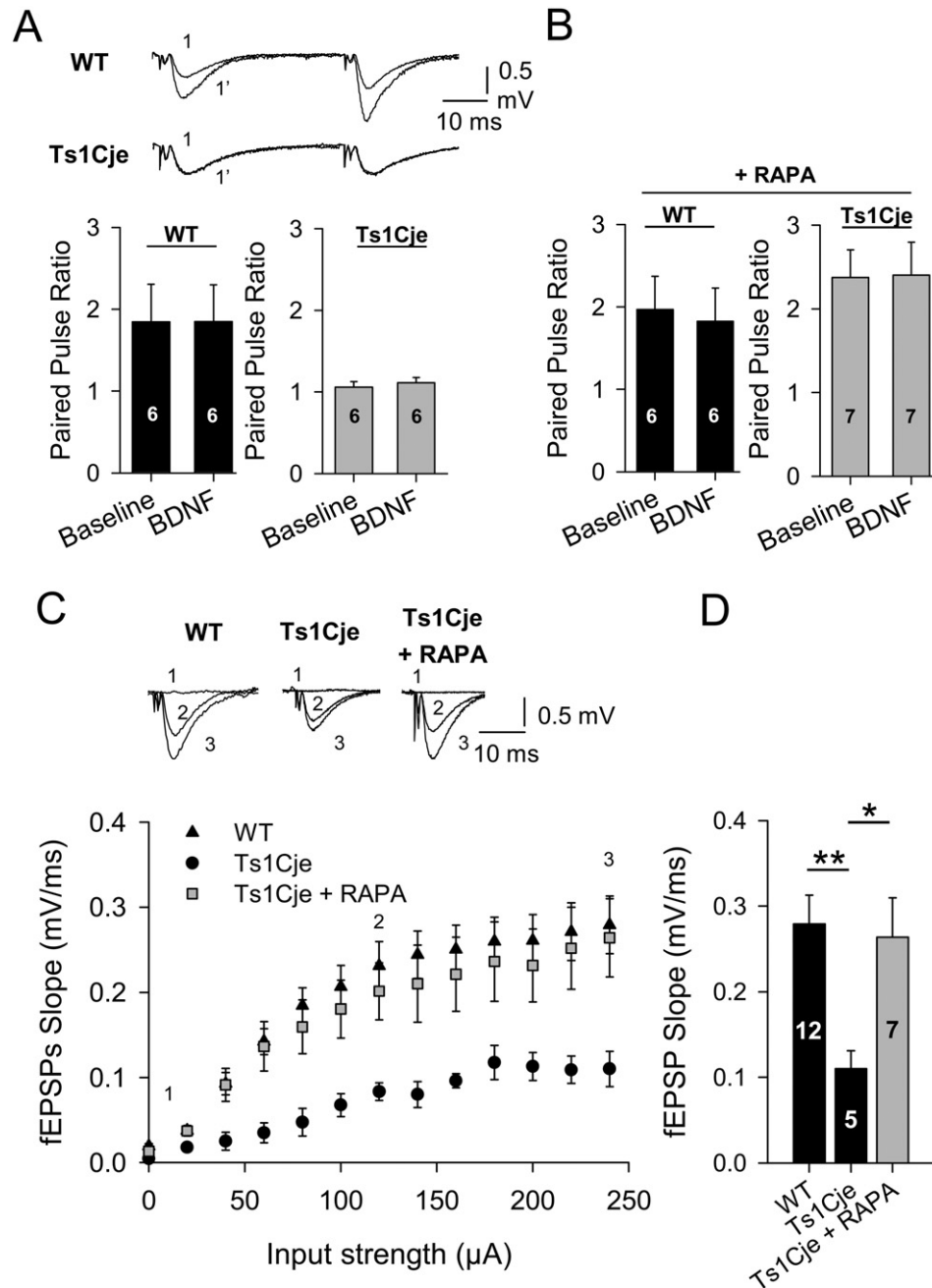


Fig. 4. Rapamycin effect on basal synaptic transmission and paired-pulse ratio (PPR) in Ts1Cje mice. PPR is unaffected by BDNF application in both wild-type and Ts1Cje mice under different experimental conditions. (A) In WT mice, paired-pulse facilitation (PPF) was observed with a 40 ms pulse interval, and it remained unaltered after BDNF application. Thus, the PPR was 1.8 ± 0.5 ($n = 6$) before BDNF treatment (baseline) and 1.8 ± 0.5 ($n = 6$) 60 min after BDNF application. Conversely, there was no facilitation in response to the paired-pulse stimulation protocol in slices from Ts1Cje mice, and similar PPR values were obtained before (baseline: 1.1 ± 0.1 ; $n = 6$) and after BDNF application (1.1 ± 0.1 ; $n = 6$). The inset shows representative traces for the PPF protocol in WT and Ts1Cje mice before (1) and after (1') BDNF application. (B) In the presence of 200 nM rapamycin, PPR at CA3–CA1 synapses before (baseline: 2.1 ± 0.5 ; $n = 6$) and after BDNF application (1.9 ± 0.5 ; $n = 6$) did not change in WT mice. The same observation was made in Ts1Cje mice (baseline: 2.5 ± 0.4 ; $n = 7$; after BDNF: 2.5 ± 0.5 ; $n = 7$). However, the baseline PPR increased significantly to wild-type levels. (C) Stimulus–strength response curves in WT ($n = 12$), Ts1Cje ($n = 5$) and Ts1Cje slices in the presence of 200 nM rapamycin ($n = 7$). Inset: representative fEPSPs traces. (D) Summary of the results shown in panel C. Note a clear difference in the response curves between WT and Ts1Cje hippocampi. Rapamycin restored this phenotype to the observed in WT slices. The error bars represent the SEM. The number of slices for each condition is indicated in the corresponding bar. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, Student's t-test.

then trained the mice over 4 days (4 trials per day). A significant decrease in primary latency (time spent to find the escape box) over time was observed in all groups ($P < 0.0001$), which demonstrates spatial acquisition (Fig. 5). Although it was not statistically significant, higher mean primary latency values were observed in vehicle-treated Ts1Cje mice on the acquisition phase when compared with untreated Ts1Cje animals (Fig. 5). In addition, when the primary latency values of the 16 given trials were plotted over time, an altered kinetics was

observed in vehicle-treated Ts1Cje mice (Supplementary Fig. 2), suggesting that learning could be slightly affected in these animals.

Twenty-four hours and 8 days after the training period, the mice were subjected to a probe trial to determine the consolidation and persistence of LTM, respectively (Sunyer et al., 2007). At 24 h, performance was similar among WT, Ts1Cje and Ts1Cje RAPA animals, and the mean time spent in the target quadrant was above chance level (i.e., 25%) in these three groups, which shows that memory was not affected

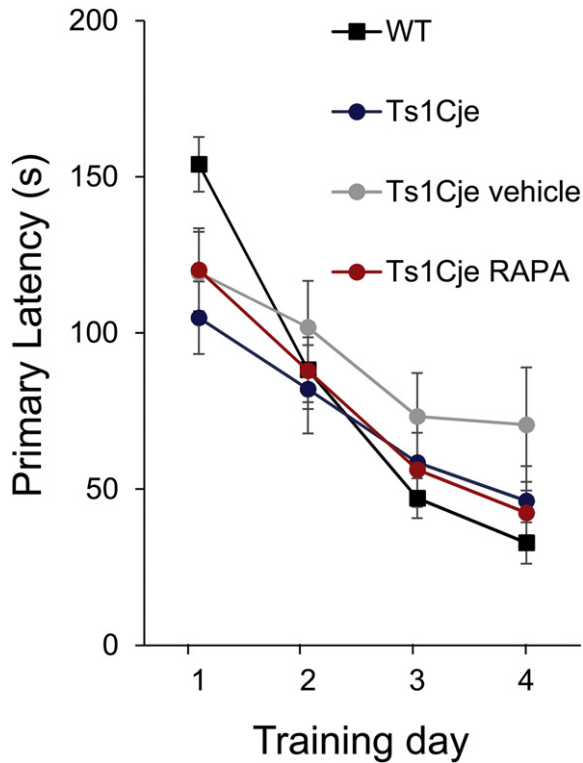


Fig. 5. Spatial learning analysis of untreated wild-type and Ts1Cje animals, and vehicle- or rapamycin-treated Ts1Cje mice. The primary latency (in seconds) to reach the target hole during training days 1 to 4 is represented for untreated wild-type (WT) and Ts1Cje animals and for Ts1Cje mice treated with vehicle (Ts1Cje vehicle) or rapamycin (Ts1Cje RAPA) before the training. The data are expressed as the mean \pm SEM of the mean values obtained for each block of 4 daily trials. When the animal was unable to find the target hole in the trial, a maximum primary latency value (i.e., 180 s) was used. A repeated-measured two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc tests resulted in $P > 0.05$ values for the comparison of all experimental groups, except for the comparison between WT and Ts1Cje mice at day 1 ($P < 0.05$). However, the same analysis performed to compare non grouped-trials (trial 1 to 16) revealed no significant difference among experimental groups. A significant decrease in primary latency over time was observed in all groups ($P < 0.0001$).

(Fig. 6). However, a lower performance (mean time spent in the target quadrant not statistically different from 25%) was found for Ts1Cje mice treated with vehicle. These data suggest that the vehicle components and/or mice handling prior to the training phase had a negative impact on trisomic mice memory consolidation.

Remarkably, the 8 day probe showed that both untreated and vehicle-treated Ts1Cje mice had reduced exploration of the correct quadrant that was not statistically above the chance level; however, rapamycin-treated Ts1Cje mice exhibited target quadrant exploration times that were similar to WT and above 25% (Fig. 6). An individual comparison of the time spent by each mouse in the target quadrant at 8 days versus 24 h showed a clear reduction in the performance of untreated Ts1Cje mice at long-term, whereas rapamycin-treated Ts1Cje animals behaved similarly at 24 h and 8 d, and similarly to WT mice (Student's paired t-test for WT 8 days versus WT 24 h, $P = 0.888$, $n = 9$; for Ts1Cje 8 days versus Ts1Cje 24 h, $P = 0.023$, $n = 10$; and for Ts1Cje RAPA 8 days versus Ts1Cje RAPA 24 h, $P = 0.903$, $n = 10$; Fig. 7A). The determination of the "time in T quadrant score", defined as the mean value of the differences between the percentage of time spent in the target quadrant at 8 days and 24 h for each individual, showed a significant negative value for untreated Ts1Cje mice, whereas the WT and Ts1Cje RAPA groups showed values near zero (Fig. 7B). The analysis of other parameters, such as primary latency (Fig. 7C, D) and number of primary errors (Fig. 7E, F), confirmed the reduction of Ts1Cje performance over time and the positive effect of rapamycin. Vehicle-treated Ts1Cje mice performance was similarly affected at

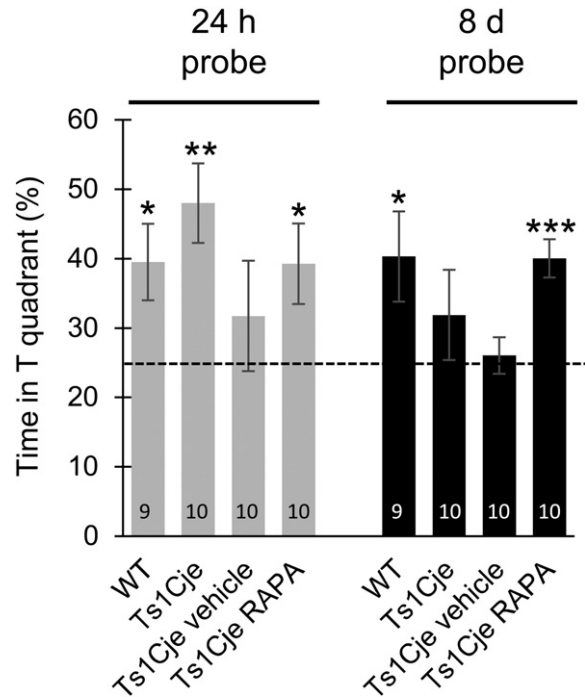


Fig. 6. Analysis of the memory consolidation and memory persistence of untreated wild-type and Ts1Cje animals, and vehicle- or rapamycin-treated Ts1Cje mice. Target quadrant occupancy (expressed as time percentage) during the probe trials given after 24 h and 8 days of (d) Barnes maze training in untreated WT and Ts1Cje mice and in trisomic animals treated with rapamycin (Ts1Cje RAPA) or vehicle (Ts1Cje vehicle). The dashed line indicates the chance level of performance (25%) in the Barnes maze. At 24 h, a one sample t-test for the mean different from 25% showed significant P values in all cases except the Ts1Cje vehicle-treated mice ($P = 0.030$ for WT, $n = 9$; $P = 0.003$ for Ts1Cje, $n = 10$; $P = 0.419$ for Ts1Cje vehicle, $n = 10$; and $P = 0.036$ for Ts1Cje RAPA, $n = 10$). At 8 days, a one sample t-test for the mean different from 25% showed a non-significant P value for only untreated and vehicle-treated Ts1Cje mice ($P = 0.046$ for WT, $n = 9$; $P = 0.318$ for Ts1Cje, $n = 10$; $P = 0.698$ for Ts1Cje vehicle, $n = 10$; and $P = 0.0004$ for Ts1Cje RAPA, $n = 10$). The data are expressed as the mean \pm SEM. The number of animals for each condition is indicated in the corresponding bar.

24 h and 8 days in all the analyzed parameters (scores not significantly different from zero; one sample t-test $P = 0.503$, $n = 10$ for "time in T quadrant score"; $P = 0.735$, $n = 10$ for "primary latency score"; $P = 0.755$, $n = 9$ for "primary errors score"; not shown).

Overall, these data demonstrate that although untreated Ts1Cje mice exhibit normal learning and memory consolidation (LTM measured at 24 h) in the Barnes maze, they show significant impairment of LTM persistence. Furthermore, rapamycin completely restores this specific memory phenotype.

4. Discussion

Although synaptic plasticity deficits have been previously reported for Ts1Cje mice (Siarey et al., 2005; Belichenko et al., 2007), here we demonstrated for the first time that CA3-CA1 BDNF-LTP is impaired in a DS mouse model. These findings may shed insight on DS intellectual disability. As mentioned previously, this form of plasticity relies on mTOR-driven local translation (Kang and Schuman, 1996; Tang et al., 2002), a process that is deregulated in Ts1Cje mice due to mTOR hyperactivation (Troca-Marin et al., 2011). Remarkably, mTOR hyperactivation has been recently reported in DS patients (Iyer et al., 2014; Perluigi et al., 2014).

We found that wild-type CA3-CA1 BDNF-LTP also depends on ERK signaling. Activation of TrkB receptors by BDNF is known to activate both the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt-mTOR and the Ras-ERK pathways, classically considered as two parallel signaling cascades. However, increasing evidences demonstrate a considerable

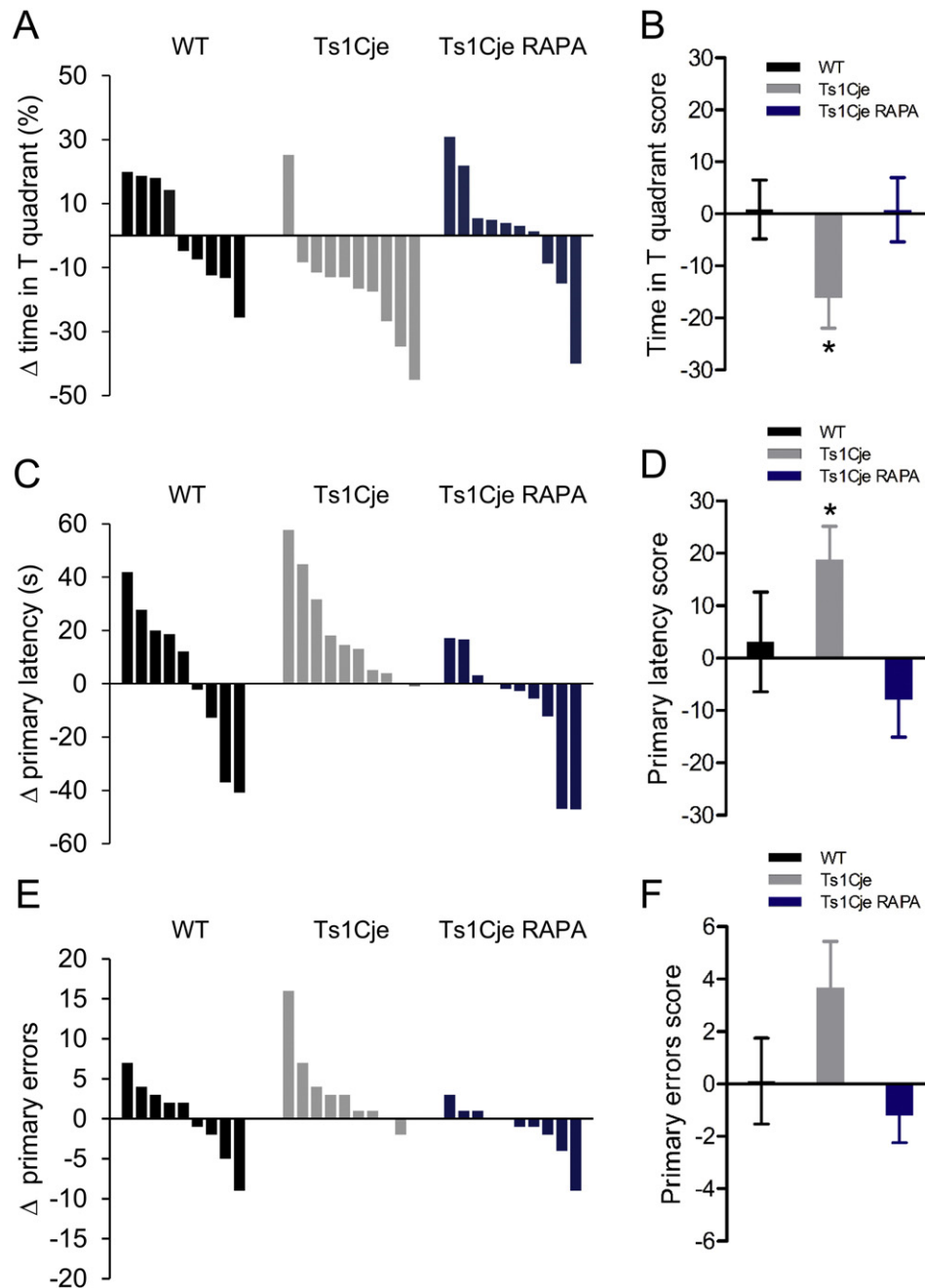


Fig. 7. Differences in target quadrant occupancy, primary latency, and primary errors in the Barnes maze probe trials at 8 days versus 24 h for each individual mouse belonging to the untreated wild-type or Ts1Cje group and to the rapamycin-treated Ts1Cje group. (A) Difference in occupancy of the target quadrant in the 8 day probe versus the 24 h probe (Δ time in T quadrant, expressed as percentage of time) for each untreated WT or Ts1Cje animal and for each rapamycin-treated Ts1Cje (Ts1Cje RAPA) mouse. (B) Time in T quadrant score (mean of the Δ time in T quadrant values showed in panel A) for untreated WT or Ts1Cje and for rapamycin-treated Ts1Cje (Ts1Cje RAPA) mice. A negative score significantly different from zero was only observed in the case of untreated Ts1Cje mice (one sample t-test, $P = 0.888$ for WT, $n = 9$; $P = 0.023$ for Ts1Cje, $n = 10$; $P = 0.903$ for Ts1Cje RAPA, $n = 10$). (C) Difference in primary latency in the 8 day probe versus the 24 h probe (Δ primary latency, expressed in seconds) for each untreated WT or Ts1Cje animal and for each rapamycin-treated Ts1Cje (Ts1Cje RAPA) mouse. (D) Primary latency score (mean of the Δ primary latency values showed in panel C) for untreated WT or Ts1Cje and for rapamycin-treated Ts1Cje (Ts1Cje RAPA) mice. A positive score significantly different from zero was observed only in the case of untreated Ts1Cje mice, indicating that animals belonging to this group took significantly more time to reach the target box at 8 days than 24 h (one sample t-test, $P = 0.756$ for WT, $n = 9$; $P = 0.015$ for Ts1Cje, $n = 10$; $P = 0.292$ for Ts1Cje RAPA, $n = 10$). Maximum primary latency values (i.e., 90 s) were used for one untreated Ts1Cje animal that was unable to find the target box in both probe trials. (E) Difference in the number of primary errors made in the 8 day probe versus the 24 h probe (Δ primary errors) by each untreated WT or Ts1Cje animal and by each rapamycin-treated Ts1Cje (Ts1Cje RAPA) mouse. (F) Primary errors score (mean of the Δ primary errors values shown in panel E) for untreated WT or Ts1Cje animals and for rapamycin-treated Ts1Cje (Ts1Cje RAPA) mice. A positive score that was nearly significantly different from zero was observed only in the case of Ts1Cje mice (one sample t-test, $P = 0.948$ for WT, $n = 9$; $P = 0.071$ for Ts1Cje, $n = 9$; $P = 0.283$ for Ts1Cje RAPA, $n = 10$). The untreated Ts1Cje animal that was unable to find the target box in both probe trials was excluded from this analysis.

cross-talk between both pathways (Fig. 8). Thus, ERK can phosphorylate and activate PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) through RSK (p90 ribosomal S6 kinase) (Frödin et al., 2000), which results in activation of the Akt–mTOR pathway in the context of CA1 high frequency stimulation (HFS)–LTP (Tsokas et al., 2007). Moreover, BDNF activates

Calpain-2 through ERK-mediated phosphorylation (Zadran et al., 2010), and it has been recently shown that this event is required for BDNF-induced mTOR activation and dendritic protein synthesis in hippocampus (Briz et al., 2013). Conversely, the PI3K–mTOR pathway is also able to influence ERK activity (Tsokas et al., 2007). The inhibitory

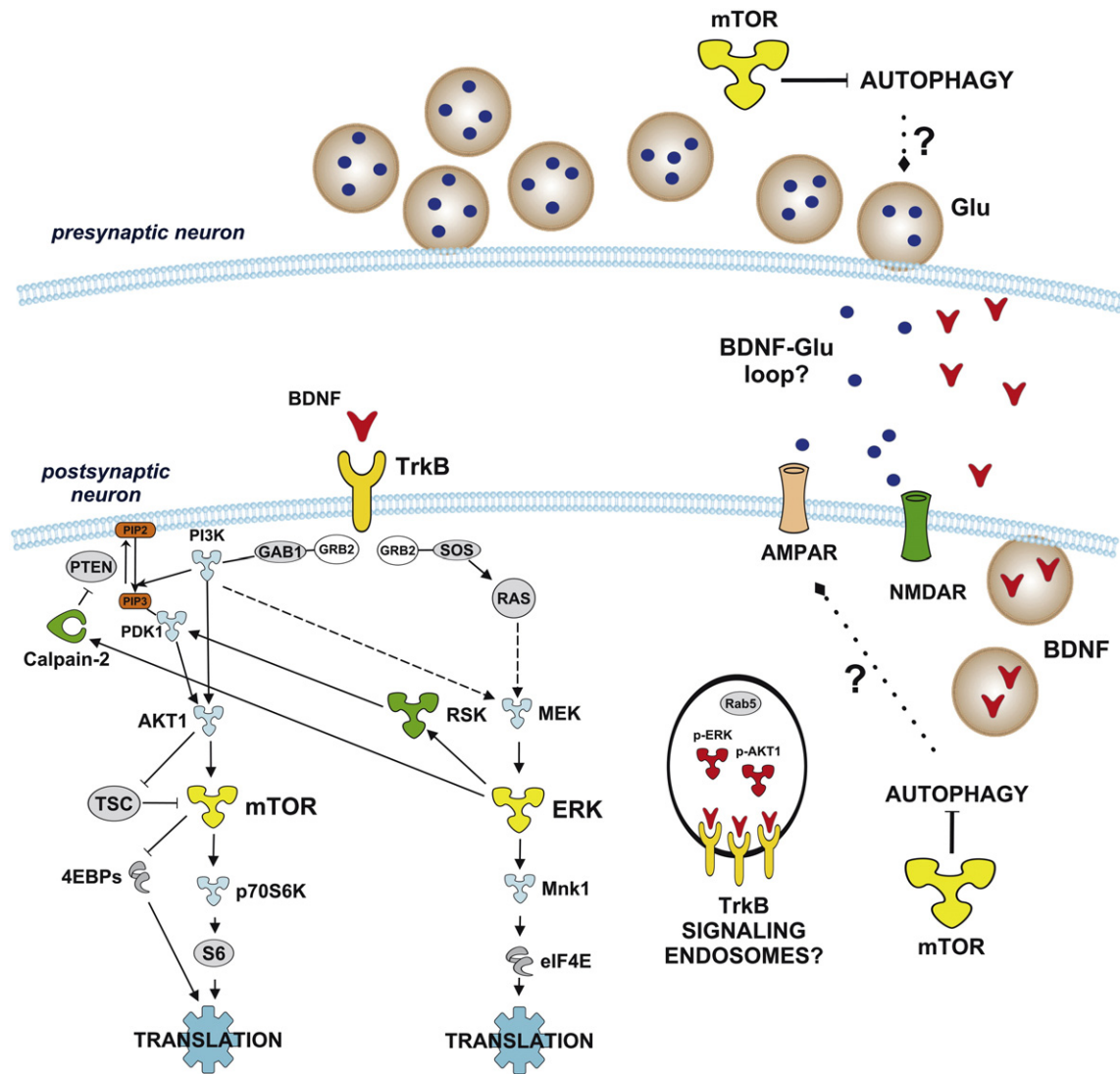


Fig. 8. Synaptic phenotypes of Ts1Cje mice and recovery by rapamycin: a model. Akt–mTOR and Ras–ERK pathways can be triggered by BDNF-activated TrkB receptors to promote local translation of proteins necessary for BDNF-LTP. ERK can indirectly activate mTOR (through RSK or Calpain-2). In WT animals, CA3–CA1 BDNF-LTP depends on mTOR and upstream ERK signaling. In Ts1Cje animals the Akt–mTOR pathway is hyperactivated and does not respond to exogenous BDNF (Troca-Marin et al., 2011). Consequently, BDNF-LTP is absent. Glutamatergic activity through NMDARs is also increased in Ts1Cje hippocampal neurons, and a “BDNF-Glu loop” has been proposed for explaining the synaptic saturation and loss of sensitivity to glutamate and BDNF (Troca-Marin et al., 2014). The mTOR inhibitor rapamycin recovers BDNF-LTP in Ts1Cje, which is elicited by a mechanism that depends on TrkB and ERK, and requires protein synthesis (as is the case in the WT). Rapamycin restores normal local dendritic translation in Ts1Cje hippocampus (Troca-Marin et al., 2011), which could include local translation of BDNF, breaking the saturating BDNF-Glu loop. In this way, the loss of synaptic sensitivity to glutamate (which could explain the Ts1Cje deficits in basal transmission and PPF) and BDNF would be normalized. Consequently, basal transmission, PPF and BDNF-LTP would be restored. Abnormal accumulation of TrkB receptors in signaling endosomes (Nosheny et al., 2015) could also impair BDNF-LTP in Ts1Cje mice. Autophagy, which is critically controlled by mTOR (and consequently targeted by rapamycin), could also be involved in the PPF and/or basal transmission deficits, by acting on presynaptic neurotransmission (Hernandez et al., 2012) and postsynaptic turnover of glutamate receptors (Shehata et al., 2012).

effect of both rapamycin and PD98059 in wild-type CA3–CA1 BDNF-LTP suggests that ERK signaling acts upstream mTOR, rather than in parallel, in this plasticity.

We found that rapamycin fully restored BDNF-LTP in the Ts1Cje hippocampus. The mechanism underlying this recovery is similar to that of wild-type BDNF-LTP, because it depends on protein synthesis (Fig. 1E, F), TrkB activity (Fig. 2), ERK signaling (Fig. 3C, D) and is likely postsynaptic (Fig. 4B and Supplementary Fig. 1). However, taking into account the complex BDNF–TrkB signaling network (Fig. 8), we cannot exclude the possibility that rapamycin-restored BDNF-LTP in Ts1Cje was exclusively due to a compensatory, enhanced Ras–ERK signaling. In this context, it is relevant to mention that the Ras–ERK pathway is functional in Ts1Cje hippocampus, since BDNF increases the dendritic amount of phosphorylated (Thr197/202) mitogen-activated protein kinase integrating kinase 1 (Mnk1) as well as (Ser209) eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) (Troca-Marin et al., 2011).

Interestingly, Ts1Cje CA3–CA1 synapses did not show facilitation in response to the paired-pulse protocol, and basal transmission was clearly impaired. These findings are in contrast with previous work by Siarey et al. (Siarey et al., 2005), who reported no differences in PPF or basal transmission between wild-type and Ts1Cje CA3–CA1 synapses. However, adult (2–3 months-old) mice were used in their study (Siarey et al., 2005). Here, we used juvenile (21–30 days-old) animals. Nevertheless, other possibilities, including genetic background differences, cannot be excluded.

The deficits in BDNF-LTP, PPF and synaptic transmission detected in our study may be a consequence of the “synaptic saturation state” that we previously found in hippocampal Ts1Cje neurons. In these cells, signaling through postsynaptic NMDAR and TrkB receptors appears to be occluded (Alves-Sampaio et al., 2010; Troca-Marin et al., 2011). The TrkB saturation is due to abnormally increased levels of BDNF/pro-BDNF, which results in both Akt–mTOR hyperactivation

and lack of further activation in response to exogenous added BDNF (Troca-Marin et al., 2011). At the pre-synaptic level, BDNF is known to bind TrkB, which enhances glutamate release (Lessmann et al., 1994; Jovanovic et al., 2000). In turn, glutamate can increase the dendritic release of BDNF/pro-BDNF (Tanaka et al., 2008). Disruption of such a “BDNF–Glu loop” (reviewed by Troca-Marin et al., 2014) by rapamycin might explain the recovery of all the Ts1Cje synaptic phenotypes we observed in this work (Fig. 8). Very interestingly, it has been recently reported that cortical synaptosomes from the DS model Ts65Dn also fail to induce further activation of the TrkB signaling pathway when exposed to BDNF (Nossheny et al., 2015). In this model, increased phospho-TrkB, phospho-Akt and phospho-ERK are found to co-localize with Rab5, a marker of early endosomes, in both GABAergic (pre- and post-synaptically) and glutamatergic (post-synaptically) synapses (Nossheny et al., 2015). Enlarged early endosomes and abnormal trafficking of neurotrophins have been reported in Ts65Dn (Cataldo et al., 2003; Cooper et al., 2001). As the authors discuss, the dysregulated TrkB signaling may contribute to synaptic dysfunction in this DS model, in particular by affecting the development of cortical inhibitory circuits and by increasing GABA release (Nossheny et al., 2015), a well established phenotype in DS (Kleschevnikov et al., 2004; Belichenko et al., 2009; Best et al., 2012; Mitra et al., 2012).

Increased and abnormal localization of activated-TrkB receptors in postsynaptic membrane subdomains of CA1 neurons, as described for cortical neurons (Nossheny et al., 2015), might also collaborate to the defective BDNF-LTP in Ts1Cje. However is less clear how rapamycin could restore BDNF-plasticity in such a scenario.

Rapamycin also restored both basal transmission and PPF in Ts1Cje animals. In the case of PPF, this mechanism of action appears to be independent of protein synthesis, TrkB activation and ERK signaling (Supplementary Fig. 1). Although linked to mTOR hyperactivation, the exact nature of this mechanism remains to be elucidated, and other hypothesis besides the “BDNF–Glu loop” could be considered. Of particular interest, mTOR is a key regulator of autophagy (reviewed by Yamamoto and Yue, 2014), and decreased autophagosome formation is observed in DS individuals (Perluigi et al., 2014). Recent data point to a role of autophagy in the regulation of the presynaptic structure and synaptic transmission, perhaps by affecting the turnover of synaptic vesicles (Hernandez et al., 2012). Interestingly, in hippocampal neurons, autophagy is also involved in α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor degradation following LTD (Shehata et al., 2012). Thus, Ts1Cje deficits in PPF and basal transmission could be related to the perturbation of the autophagic function due to mTOR dysregulation.

In this work, we also addressed the therapeutic potential of rapamycin for reversing Ts1Cje memory deficits. In contrast to the previous report using the Morris water maze (Sago et al., 1998), Ts1Cje learning was not affected in the Barnes maze. The mating system used by Sago et al. (Ts1Cje males on a CD1 background; Sago et al., 1998) differs from ours; therefore, it is possible that these contrasting findings are due to genetic background, a factor that crucially influences mouse behavior (Holmes et al., 2002). However, as previously mentioned, the Barnes maze test is also less stressful for mice, another strong factor that affects behavior. In fact, vehicle-injected Ts1Cje mice showed a particular behavioral phenotype during the training phase and a lower performance in the 24 h-probe trial when compared with untreated Ts1Cje animals. This finding may be due to higher stress levels in the former group, related to the handling and intraperitoneal injections previous to the training phase. In any case, it is important to stress that, although Sago et al. (Sago et al., 1998) found a statistically significant reduction in the performance of Ts1Cje mice in the Morris water maze when compared with wild-type mice, the trisomic animals also showed a reduction in latency over time during the training phase and spent more than the 25% of the time in the target quadrant in the probe trial, as is the case in our study, demonstrating that the mice retained

the capacity to learn the Morris water maze task (Sago et al., 1998), as we show here for the Barnes maze.

In this study, we found that the persistence of LTM (measured as performance in the 8 day probe trial) was impaired in both untreated and vehicle-injected Ts1Cje mice and restored by rapamycin (Fig. 6). Interestingly, the persistence of LTM storage requires hippocampal protein synthesis and a BDNF-dependent phase (Bekinschtein et al., 2007). However, it is important to highlight that the deficits in synaptic plasticity and memory described here for Ts1Cje mice, although relying on mTOR hyperactivation in both cases, are not necessarily interdependent. Although rapamycin completely abolished CA3–CA1 BDNF-LTP in wild-type slices (Tang et al., 2002 and Fig. 1B, C), rapamycin-treated WT mice showed only subtle deficits in the Barnes maze test at 24 h, and a normal performance at 8 days (Supplementary Table 1). Conversely, in spite of completely lacking BDNF-potential, the performance of untreated Ts1Cje mice in the Barnes maze 24 h after training was unaffected (Fig. 6), suggesting that LTM in Barnes maze depends on a type of synaptic plasticity different from hippocampal BDNF-LTP. Notably, other plasticity forms are impaired but not completely abolished in Ts1Cje mice (Siarey et al., 2005), and might be sufficient to maintain spatial memory during that relatively short period of time. In particular, as discussed above, the Ras–ERK signaling pathway, which is also under the control of BDNF through TrkB receptors, is not affected in Ts1Cje hippocampus (Troca-Marin et al., 2011). In this context, it is interesting to mention that maintenance of HFS–LTP in the hippocampal DG is rapamycin-insensitive, but depends on TrkB–ERK signaling to the translational machinery (Panja et al., 2009, 2014). Moreover, induction of BDNF-LTP in the DG is also ERK-dependent (Ying et al., 2002). These types of plasticity could be involved in Barnes-maze LTM. Furthermore, the impaired persistence of LTM found both in untreated and vehicle-treated Ts1Cje animals might rely on cortical, rather than hippocampal, mechanisms (Alonso et al., 2005).

Future experiments will further elucidate the signaling pathways and plasticity types involved in these memory phenotypes.

5. Conclusion

In conclusion, rapamycin fully restores basal transmission, PPF, BDNF-dependent plasticity, LTM persistence in Barnes maze (shown here) and local translation rates (Troca-Marin et al., 2011) in Ts1Cje mice. In addition, mTOR hyperactivation has been found in Ts1Cje mice (Troca-Marin et al., 2011) and in DS patients (Iyer et al., 2014; Perluigi et al., 2014). Importantly, rapamycin is already approved for human use. Taking into account all these arguments, rapamycin/rapalogs might represent a therapeutic opportunity for improving cognition in DS, which deserves further future investigation.

Acknowledgments

This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad (Instituto de Salud Carlos III, Spain; Grant PI1100507), the Fondation Jérôme Lejeune (France) and the Junta de Andalucía (Grant P12-CTS-1818) to M.L.M. and the Ministerio de Economía y Competitividad (Grant BFU2012-38208) and the Junta de Andalucía (Grant P11-CVI-7290) to A.R.M. We thank Paloma Duque-Feria and Beatriz Galán-Rodríguez for technical help and advice in some of the experiments and Francisco J. Tejedor for his critical comments on this manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2015.09.005>.

References

- Alonso, M., Bekinschtein, P., Cammarota, M., Vianna, M.R., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2005. Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learn. Mem.* 12, 504–510.
- Alves-Sampaio, A., Troca-Marin, J.A., 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.
- Andrade-Talavera, Y., Duque-Feria, P., Negrete-Diaz, J.V., Sihra, T.S., Flores, G., Rodriguez-Moreno, A., 2012. Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves Ca_2^+ – calmodulin in mossy fiber–CA3 synapses. *J. Neurochem.* 122, 891–899.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L.M., Bevilacqua, L.R., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2007. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53, 261–277.
- Belichenko, P.V., Kleschevnikov, A.M., Masliah, E., Wu, C., Takimoto-Kimura, R., Salehi, A., Mobley, W.C., 2009. Excitatory–inhibitory relationship in the fascia dentata in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J. Comp. Neurol.* 512, 453–466.
- Belichenko, P.V., Kleschevnikov, A.M., Salehi, A., Epstein, C.J., Mobley, W.C., 2007. Synaptic and cognitive abnormalities in mouse models of Down syndrome: exploring genotype–phenotype relationships. *J. Comp. Neurol.* 504, 329–345.
- Best, T.K., Cramer, N.P., Chakrabarti, L., Haydar, T.F., Galdzicki, Z., 2012. Dysfunctional hippocampal inhibition in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Exp. Neurol.* 233, 749–757.
- Briz, V., Hsu, Y.T., Li, Y., Lee, E., Bi, X., Baudry, M., 2013. Calpain-2-mediated PTEN degradation contributes to BDNF-induced stimulation of dendritic protein synthesis. *J. Neurosci.* 33, 4317–4328.
- Buffington, S.A., Huang, W., Costa-Mattioli, M., 2014. Translational control in synaptic plasticity and cognitive dysfunction. *Annu. Rev. Neurosci.* 37, 17–38.
- Carlesimo, G.A., Marotta, L., Vicari, S., 1997. Long-term memory in mental retardation: evidence for a specific impairment in subjects with Down's syndrome. *Neuropsychologia* 35, 71–79.
- Cataldo, A.M., Petanceska, S., Peterhoff, C.M., Terio, N.B., Epstein, C.J., Villar, A., Carlson, E.J., Staufenbiel, M., Nixon, R.A., 2003. App gene dosage modulates endosomal abnormalities of Alzheimer's disease in a segmental trisomy 16 mouse model of Down syndrome. *J. Neurosci.* 23, 6788–6792.
- Cooper, J.D., Salehi, A., Delcroix, J.D., Howe, C.L., Belichenko, P.V., Chua-Couzens, J., Kilbridge, J.F., Carlson, E.J., Epstein, C.J., Mobley, W.C., 2001. Failed retrograde transport of NGF in a mouse model of Down's syndrome: reversal of cholinergic neurodegenerative phenotypes following NGF infusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10439–10444.
- Frödin, M., Jensen, C.J., Merienne, K., Gammeltoft, S., 2000. A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1. *EMBO J.* 19, 2924–2934.
- Hernandez, D., Torres, C.A., Setlik, W., Cebrían, G., Mosharov, E.V., Tang, G., Cheng, H.C., Kholidilov, N., Yarygina, O., Burke, R.E., Gershon, M., Sulzer, D., 2012. Regulation of presynaptic neurotransmission by macroautophagy. *Neuron* 74, 277–284.
- Holmes, A., Wrenn, C.C., Harris, A.P., Thayer, K.E., Crawley, J.N., 2002. Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes Brain Behav.* 1, 55–69.
- Hölscher, C., 1999. Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behav. Brain Res.* 100, 225–235.
- Iyer, A.M., van Scheppingen, J., Milenkovic, I., Anink, J.J., Adle-Biasette, H., Kovacs, G.G., Aronica, E., 2014. mTOR hyperactivation in Down syndrome hippocampus appears early during development. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 73, 671–683.
- Jovanovic, J.N., Czernik, A.J., Fienberg, A.A., Greengard, P., Sihra, T.S., 2000. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat. Neurosci.* 3, 323–329.
- Kang, H., Schuman, E.M., 1995. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 267, 1658–1662.
- Kang, H., Schuman, E.M., 1996. A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* 273, 1402–1406.
- Kleschevnikov, A.M., Belichenko, P.V., Villar, A.J., Epstein, C.J., Malenka, R.C., Mobley, W.C., 2004. Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome. *J. Neurosci.* 24, 8153–8160.
- Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., Bonhoeffer, T., 1995. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8856–8860.
- Kwon, C.H., Zhu, X., Zhang, J., Baker, S.J., 2003. mTor is required for hypertrophy of Pten-deficient neuronal soma in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12923–12928.
- Lessmann, V., Gottmann, K., Heumann, R., 1994. BDNF and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones. *Neuroreport* 6, 21–25.
- Linnarsson, S., Björklund, A., Ernfors, P., 1997. Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2581–2587.
- Mitra, A., Blank, M., Madison, D.V., 2012. Developmentally altered inhibition in Ts65Dn, a mouse model of Down syndrome. *Brain Res.* 1440, 1–8.
- Mizuno, M., Yamada, K., Olariu, A., Nawa, H., Nabeshima, T., 2000. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J. Neurosci.* 20, 7116–7121.
- Nosheny, R.L., Belichenko, P.V., Busse, B.L., Weissmiller, A.M., Dang, V., Das, D., Fahimi, A., Salehi, A., Smith, S.J., Mobley, W.C., 2015. Increased cortical synaptic activation of TrkB and downstream signaling markers in a mouse model of Down syndrome. *Neurobiol. Dis.* 77, 173–190.
- Panja, D., Bramham, C.R., 2014. BDNF mechanisms in late LTP formation: a synthesis and breakdown. *Neuropharmacology* 76 (Pt C), 664–676.
- Panja, D., Dayte, G., Bidinosti, M., Wibbrand, K., Kristiansen, A.M., Sonenberg, N., Bramham, C.R., 2009. Novel translational control in arc-dependent long term potentiation consolidation in vivo. *J. Biol. Chem.* 284, 31498–31511.
- Panja, D., Kenney, J.W., D'Andrea, L., Zalfa, F., Vedeler, A., Wibbrand, K., Fukunaga, R., Bagni, C., Proud, C.G., Bramham, C.R., 2014. Two-stage translational control of dentate gyrus LTP consolidation is mediated by sustained BDNF-TrkB signaling to MNK. *Cell Rep.* 9, 1430–1445.
- Patterson, S.L., Abel, T., Deuel, T.A., Martin, K.C., Rose, J.C., Kandel, E.R., 1996. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16, 1137–1145.
- Pennington, B.F., Moon, J., Edgin, J., Stedron, J., Nadel, L., 2003. The neuropsychology of Down syndrome: evidence for hippocampal dysfunction. *Child Dev.* 74, 75–93.
- Perluigi, M., Pupo, G., Tramutola, A., Cini, C., Coccia, R., Barone, E., Head, E., Butterfield, D.A., Di Domenico, F., 2014. Neuropathological role of PI3K/Akt/mTOR axis in Down syndrome brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 1144–1153.
- Rodriguez-Moreno, A., Sistiaga, A., Lerma, J., Sanchez-Prieto, J., 1998. Switch from facilitation to inhibition of excitatory synaptic transmission by group I mGluR desensitization. *Neuron* 21, 1477–1486.
- Sago, H., Carlson, E.J., Smith, D.J., Kilbridge, J., Rubin, E.M., Mobley, W.C., Epstein, C.J., 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.
- Shehata, M., Matsumura, H., Okubo-Suzuki, R., Ohkawa, N., Inokuchi, K., 2012. Neuronal stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor degradation after chemical long-term depression. *J. Neurosci.* 32, 10413–10422.
- Siarey, R.J., Villar, A.J., Epstein, C.J., Galdzicki, Z., 2005. Abnormal synaptic plasticity in the Ts1Cje segmental trisomy 16 mouse model of Down syndrome. *Neuropharmacology* 49, 122–128.
- Sunyer, B., Patil, S., Höger, H., Lubec, G., 2007. Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. *Protoc. Exch.* <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.390>.
- Takei, N., Inamura, N., Kawamura, M., Namba, H., Hara, K., Yonezawa, K., Nawa, H., 2004. Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *J. Neurosci.* 24, 9760–9769.
- Tanaka, J., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G.C., Kasai, H., 2008. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science* 319, 1683–1687.
- Tang, S.J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A.C., Sonenberg, N., Schuman, E.M., 2002. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 467–472.
- Thomas, G.M., Huganir, R.L., 2004. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 173–183.
- Troca-Marin, J.A., Alves-Sampaio, A., 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.
- Troca-Marin, J.A., Casañas, J.J., Benito, I., Montesinos, M.L., 2014. The Akt–mTOR pathway in Down's syndrome: the potential use of rapamycin/rapalogs for treating cognitive deficits. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 13, 34–40.
- Tsokas, P., Ma, T., Iyengar, R., Landau, E.M., Blitzer, R.D., 2007. Mitogen-activated protein kinase upregulates the dendritic translation machinery in long-term potentiation by controlling the mammalian target of rapamycin pathway. *J. Neurosci.* 27, 5885–5894.
- Yamamoto, A., Yue, Z., 2014. Autophagy and its normal and pathogenic states in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 37, 55–78.
- Ying, S.W., Futter, M., Rosenblum, K., Webber, M.J., Hunt, S.P., Bliss, T.V.P., Bramham, C.R., 2002. Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of arc synthesis. *J. Neurosci.* 22, 1532–1540.
- Zadran, S., Jourdi, H., Rostamiani, K., Qin, Q., Bi, X., Baudry, M., 2010. Brain-derived neurotrophic factor and epidermal growth factor activate neuronal m-calpain via mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation. *J. Neurosci.* 30, 1086–1095.