

REVISTA MÉDICA INTERNACIONAL SOBRE EL SÍNDROME DE DOWN

www.elsevier.es/sd



ORIGINAL

Identificación de genes clave implicados en el síndrome de Down mediante terapia génica

C. Fillat^{a,b*}, X. Bofill-De Ros^{a,b}, M. Santos^{b,c}, E.D. Martín^d, N. Andreu^c, E. Villanueva^{a,b}, D. d'Amico^c, M. Dierssen^{b,c} y X. Altafaj^{e,*}

^aInstitut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, España

^bCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, España

^cCentre de Regulació Genòmica (CRG), Barcelona, España

^dLaboratorio de Neurofisiología y Plasticidad sináptica, Universidad de Castilla la Mancha, Albacete, España

^eInstitut d'Investigacions Biomèdiques de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España

Recibido el 14 de abril de 2014; aceptado el 19 de junio de 2014

PALABRAS CLAVE

Síndrome de Down;
Dyrk1A;
miRNA;
Terapia génica

Resumen

La terapia génica nos ofrece la posibilidad de manipular los virus para convertir un agente infeccioso en un vehículo que transporta en su genoma secuencias de DNA con potencial terapéutico. En este trabajo hemos aprovechado la metodología que nos proporciona la terapia génica para desarrollar vectores virales derivados de virus adenoasociados y lentivirus con el objetivo de identificar genes clave (proteínas o microRNA [miRNA]) implicados en las alteraciones cognitivas presentes en el síndrome de Down (SD). Hemos demostrado que en un contexto de trisomía, como es el modelo de ratón Ts65Dn, la normalización de la expresión de Dyrk1A a través de la administración de los virus adenoasociados AAV2/1-shDyrk1A contribuye a restablecer la regulación de moléculas clave en los procesos de memoria y aprendizaje. Ello permite una atenuación de los defectos en plasticidad sináptica y facilita el desarrollo de una estrategia de aprendizaje visuoespacial más eficiente. Estos estudios refuerzan el papel destacado de Dyrk1A en los procesos cognitivos. Por otro lado, la estrategia de control de la expresión de miRNA desarrollada mediante los lentivirus Lv-anti-miR155-802 nos permite proponer a *MeCP2* como un gen cuya desregulación en el síndrome de Down puede tener un papel clave en el deterioro cognitivo.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cfillat@clinic.ub.es (C. Fillat)
y xaltafaj@idibell.cat (X. Altafaj).

KEY WORDS

Down's syndrome;
Dyrk1A;
miRNA;
Gene therapy

Identification of key genes involved in Down syndrome pathogenesis by gene therapy**Abstract**

Viruses have evolved ways of encapsulating and delivering their genes into human cells. Gene therapy takes advantage of this capability to manipulate the viral genome and convert an infectious agent into an efficient vector that delivers therapeutic genes. In the current work we have applied gene therapy approaches based on adeno-associated virus and lentivirus delivery to identify candidate genes (protein-coding or miRNAs) involved in the cognitive deficits in Down Syndrome. We show that the hippocampal injection of the adeno-associated virus AAV2/1-shDyrk1A normalized Dyrk1A expression in the trisomic Ts65Dn mice. As a consequence the regulation of key molecular players in memory and learning processes was rescued and mice showed an attenuation of synaptic plasticity defects and improved efficacy in learning strategies. All together these results reinforce the role of Dyrk1A in cognition. On the other hand, with the lentiviral strategy developed to specifically inhibit miR-155 and miR-802 (Lv-anti-miR155/802), we were able to show a tight control of the miRNAs target MeCP2 suggesting that the downregulation of MeCP2 in Down syndrome could be a contributing factor to the cognitive defects.

El cromosoma 21

La presencia de una copia completa o parcial del cromosoma 21 (Hsa21) es la causa del síndrome de Down (SD). Este exceso de material genético en las células del organismo conlleva una desregulación en la expresión de ciertos genes. El impacto funcional de estos cambios puede ser consecuencia directa de la acción de las proteínas expresadas por genes del Hsa21 en exceso, o indirecta a través de las proteínas que regulan. En cualquier caso, el efecto va a ser distinto según de qué proteína se trate.

En algunos casos puede que el exceso de una determinada proteína sea inocuo, mientras que pequeños cambios en la expresión de proteínas clave pueden ser suficientes para alterar procesos y funciones celulares fundamentales. En los últimos años se ha descubierto que el genoma contiene genes que no codifican para proteínas, pero que se transcriben para dar lugar a RNA pequeños, microRNA (miRNA) que ejercen una regulación negativa de la expresión génica. Cada miRNA puede actuar sobre un gran número de proteínas, por lo que cambios en un único miRNA pueden condicionar la expresión de un gran número de proteínas y así tener un impacto muy notable en determinadas funciones celulares. En el cromosoma 21 se han descrito varios miRNA, cinco de los cuales (miR-99a, miR-125b-2, miR-155, miR-802 y let7-c) se han detectado en exceso en algunos tejidos¹. La presencia en exceso de estos miRNA sugiere que, en condiciones de trisomía, algunas proteínas de las reguladas por estos miRNA estarían subexpresadas, y la falta de estas podría provocar una alteración en los procesos fisiológicos en los que participan.

El desequilibrio que se produce en las proteínas de las células en trisomía, mediado bien por genes codificantes o no codificantes (como los miRNA), tiene una relevancia dependiente del gen. Mientras que para determinados genes los efectos compensatorios pueden mitigar el impacto del desequilibrio génico, para otros estos cambios pueden llegar a tener un alto impacto funcional. Ello pone de manifiesto el papel crítico de determinados genes dependientes

de dosis. Es importante identificar estos elementos del genoma sensibles a dosis, para poder comprender bien sus efectos y su impacto patogénico.

La terapia génica como estrategia para estudiar los efectos de genes sensibles a dosis

La terapia génica consiste en la transferencia de material genético a las células de un individuo con la finalidad de corregir los defectos genéticos y poder revertir el curso de la enfermedad o paliar algunos de sus síntomas. Su desarrollo tiene lugar principalmente, aunque no exclusivamente, para el tratamiento de enfermedades hereditarias en las que la alteración causal reside en mutaciones en un gen conocido, que impiden la expresión correcta de la proteína y por tanto su función. Actualmente hay un número significativo de ensayos de terapia génica, especialmente para el tratamiento de algunas enfermedades raras²⁻⁴. Es de destacar que en noviembre de 2012, la Comisión Europea aprobó el primer medicamento de terapia génica y fue para el tratamiento de un déficit en la lipoproteína lipasa⁵. Se están llevando a cabo también ensayos clínicos de terapia génica para el tratamiento de enfermedades complejas, como puede ser la enfermedad de Alzheimer (número de registro en clinicaltrials.gov: NCT00876863). En este sentido, es posible que, en un futuro, personas con SD puedan entrar en ensayos clínicos de terapia génica, tanto para el tratamiento de las alteraciones de tipo Alzheimer asociadas al SD como para otras manifestaciones clínicas presentes en los individuos con SD. Sin embargo, hoy por hoy todavía no se han incluido personas con SD en ningún ensayo clínico.

Por otro lado, la terapia génica ha facilitado en gran medida el desarrollo de numerosas herramientas y estrategias para abordar el tratamiento de las enfermedades, avances que tienen interés para muchas otras aplicaciones, no necesariamente terapéuticas. Uno de los elementos clave ha sido el desarrollo de vectores virales, en los cuales se apro-

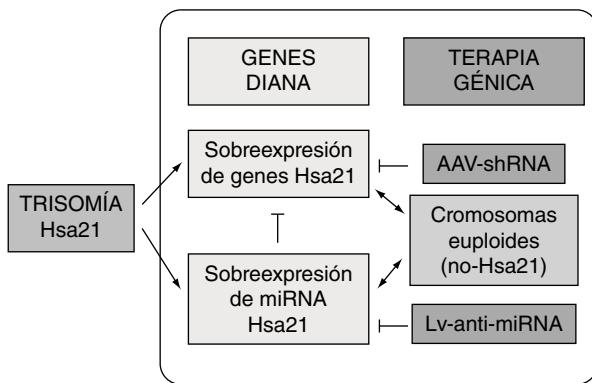


Figura 1 Alteraciones genéticas en el síndrome de Down y estrategias de terapia génica desarrolladas en el presente trabajo. La presencia de una copia adicional del Hsa21 provoca un exceso de dosis de los genes y de los miRNA presentes en Hsa21. La sobreexpresión de miRNA puede alterar la expresión de genes, tanto ubicados en el Hsa21 como en otros cromosomas. A su vez, la expresión alterada de estos genes puede tener efectos sobre el transcriptoma. El esquema ilustra las dos estrategias de terapia génica desarrolladas en el presente trabajo, basadas en la modulación de la expresión de genes (AAV-shRNA) o de miRNA (Lv-anti-miRNA) del Hsa21 mediante virus modificados.

vecha la capacidad de un virus de infectar las células, para transformarlos en virus recombinantes, defectivos en replicación, capaces de transportar elementos génicos que se van a expresar en el interior de la célula diana.

En este trabajo demostramos que la terapia génica constituye una nueva oportunidad para identificar genes clave en la fisiopatología del SD. Hemos desarrollado una estrategia basada en el uso de vectores virales para: *a*) modular la expresión de *Dyrk1A*, gen para el que hay evidencias previas de su sobreexpresión en el SD y de ser sensible a dosis génica y *b*) modular el contenido de dos de los miRNA presentes en triple copia en el Hsa21 (fig. 1). Hemos estudiado el impacto funcional que la modulación de estos elementos ejerce sobre los procesos de memoria y aprendizaje, que en el modelo de ratón trisómico Ts65Dn poseen notables alteraciones cognitivas^{6,7}. Estos animales poseen una trisomía parcial del cromosoma 16 murino (MMU16), sintético a Hsa21, que comprende en triple dosis más de 100 genes, entre ellos *Dyrk1A* y los miRNA miR-155 y miR-802.

Impacto de la normalización de *Dyrk1A* en el hipocampo de ratones Ts65Dn sobre aspectos cognitivos

El gen *Dyrk1A* codifica para una proteína cinasa cuya función es fosforilar otras proteínas, entre ellas algunas relevantes en procesos de memoria, aprendizaje o desarrollo cerebral. *Dyrk1A* es un gen relevante por lo que se desprende tanto de las funciones celulares en las que participa (neurogénesis, supervivencia neuronal, diferenciación) como de su notable sobreexpresión en cerebros de individuos con SD, además de su implicación en alteraciones motoras y cognitivas demostradas en modelos de ratón con diferente dosis génica de *Dyrk1A*⁸⁻¹¹.

Sin embargo el papel de *Dyrk1A* en un contexto de trisomía no se había descrito. Por ello desarrollamos la estrategia de terapia génica dirigida a normalizar la expresión de *Dyrk1A* en ratones Ts65Dn y estudiar su impacto sobre la reversión de las alteraciones cognitivas. Utilizamos construcciones moleculares basadas en la tecnología de la interferencia del RNA (RNAi). En concreto, se diseñaron secuencias de RNA de tipo *short hairpin* complementarias a una región del RNA mensajero (mRNA) de *Dyrk1A* con el objetivo de que estas secuencias puedan sufrir un apareamiento y a través de los mecanismos de RNAi tenga lugar bien la degradación del mRNA de *Dyrk1A* impidiendo su traducción a proteína. Eso va a dar lugar a una menor cantidad de *Dyrk1A* por célula, lo que debería permitir obtener niveles normales del contenido de proteína, contrarrestando así su sobreexpresión.

La construcción diseñada llevaba también un gen de lucifera莎 para poder seguir la expresión *in vivo*, y todo ello encapsulado dentro de virus adenoasociados, con un genoma de serotipo 2 y una cápside de serotipo 1 (AAV2/1) para garantizar la transducción de células neuronales. Se generó así el AAV2/1-sh*Dyrk1A* (SH) y un virus control con una secuencia que no interfería con *Dyrk1A*, AAV2/1-sc*Dyrk1A* (SC) (fig. 2A). Ambos virus fueron eficientes en la transducción de poblaciones neuronales (Tuj positivas) y poblaciones gliales (GFAP positivas) (fig. 2B) y únicamente se observó una disminución en la expresión de *Dyrk1A* en cultivos primarios de neuronas de la corteza de ratón con el virus SH (fig. 2C). También pudimos observar una transducción eficiente *in vivo* en ratones Ts65Dn tras la inyección hipocámpica. La presencia de virus en el hipocampo fue selectiva y no se detectó en otras regiones del cerebro, tal y como puede observarse por la actividad lucifera莎 analizada en diferentes regiones a las 2 semanas de la inyección (fig. 2D). A las dosis virales inyectadas pudimos observar una normalización en la expresión de *Dyrk1A* en los ratones Ts65Dn tratados con los virus SH, mientras que la sobreexpresión se mantenía en los ratones SC (fig. 2E).

A continuación estudiamos la implicación de *Dyrk1A* en alteraciones celulares, electrofisiológicas y conductuales presentes en los ratones Ts65Dn utilizando los virus desarrollados, capaces de normalizar *Dyrk1A* en un contexto de trisomía. Durante los procesos de memoria y aprendizaje hay una activación sostenida de la liberación de neurotransmisores excitadores que provoca la activación de las neuronas postsinápticas. Al ser activadas, la señal se transmite dentro de la célula a través de la activación de diferentes vías de señalización intracelular, algunas de las cuales están alteradas en los ratones Ts65Dn. La forma fosforilada de Erk1 y del factor de transcripción CREB fueron normalizados en los ratones tratados con el virus SH, donde se conseguía una normalización en la expresión de la proteína, indicando que *Dyrk1A* estaría asociada a modificaciones en componentes de la vía Erk-CREB implicados en procesos de memoria y aprendizaje (fig. 3A). Además, estudios electrofisiológicos demostraron que los animales tratados con el virus SH presentaban cambios en la actividad eléctrica de las neuronas cuando se media a través de un paradigma que permite evaluar la plasticidad sináptica, la potenciación a largo plazo (LTP, *long-term potentiation*), considerado un modelo para explicar los cambios eléctricos subyacentes a determinados procesos de aprendizaje y memoria. Previamente, se había descrito un

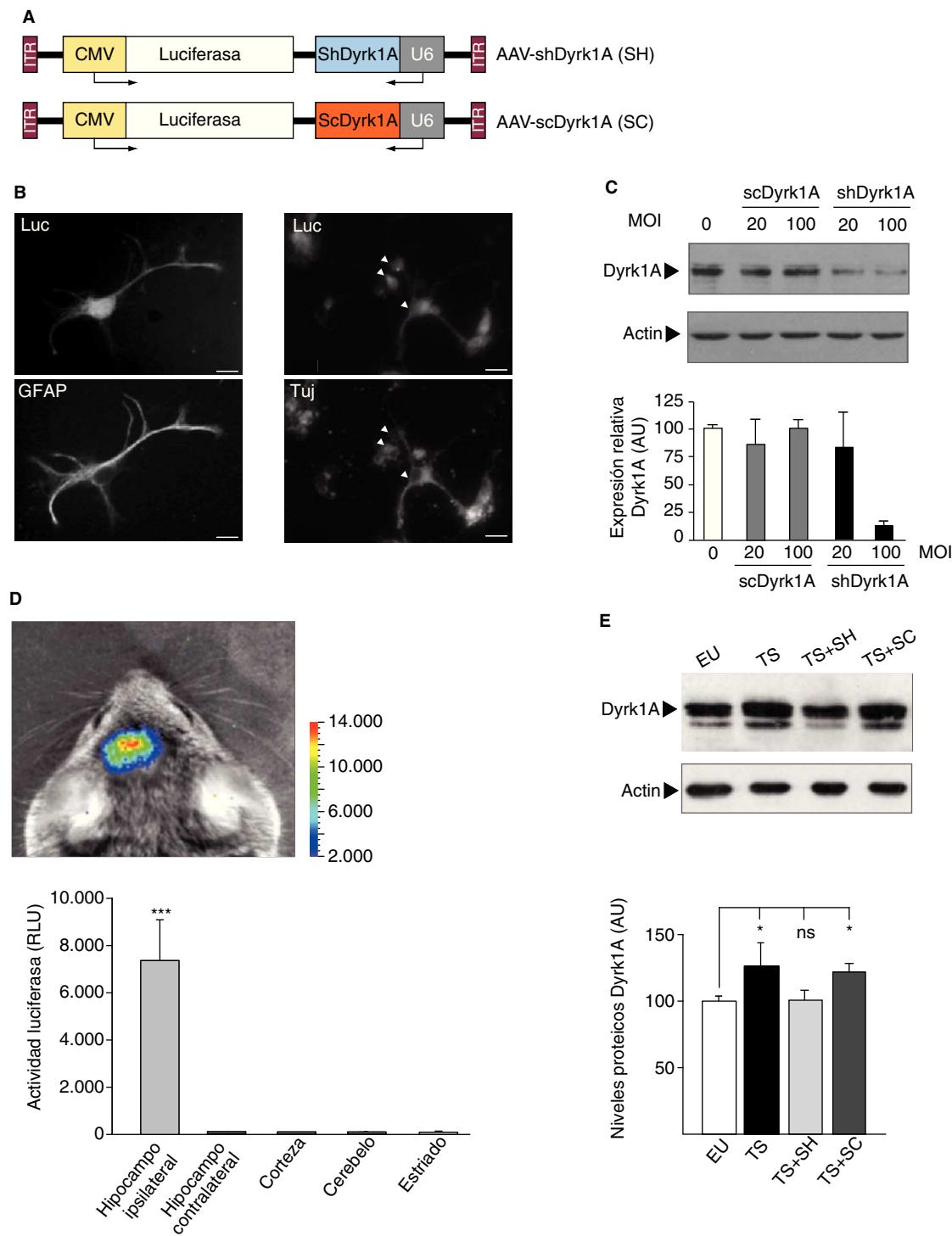


Figura 2 Validación de la capacidad de los virus terapéuticos AAV2/1-shDyrk1A para normalizar la expresión de Dyrk1A en cultivos neuronales y en hipocampo de ratones Ts65Dn. A. Construcción genética utilizada para reducir la expresión de Dyrk1A en el genoma de un virus adenoasociado AAV2/1. La construcción contiene también un gen marcador de la luciferasa que permitirá trazar la infección viral tanto *in vitro* como *in vivo*. B. Análisis por inmunofluorescencia de la capacidad del AAV2/1-shDyrk1A (detectado mediante el marcaje con anticuerpos dirigidos contra la luciferasa, luc) de infectar neuronas (expresando el antígeno neuronal “Tuj”) y células gliales (expresando el antígeno glial “GFAP”). C. Expresión de Dyrk1A en cultivos primarios de neuronas transducidas con el virus SH o el virus control SC a diferentes dosis. D. Expresión de luciferasa en ratones Ts65Dn inyectados en el hipocampo con AAV2/1-shDyrk1A. La imagen de la izquierda muestra la señal de bioluminiscencia *in vivo* (con el animal tratado anestesiado), correspondiente a la zona inyectada. A la derecha, el histograma muestra la actividad luciferasa en diferentes regiones disecionadas del cerebro de ratones tratados, 15 días tras la inyección. E. Análisis por Western blot de la expresión de Dyrk1A en el hipocampo de ratones euploides (EU), trisómicos (TS) y trisómicos inyectados con el virus shDyrk1A (SH) o scDyrk1A (SC).

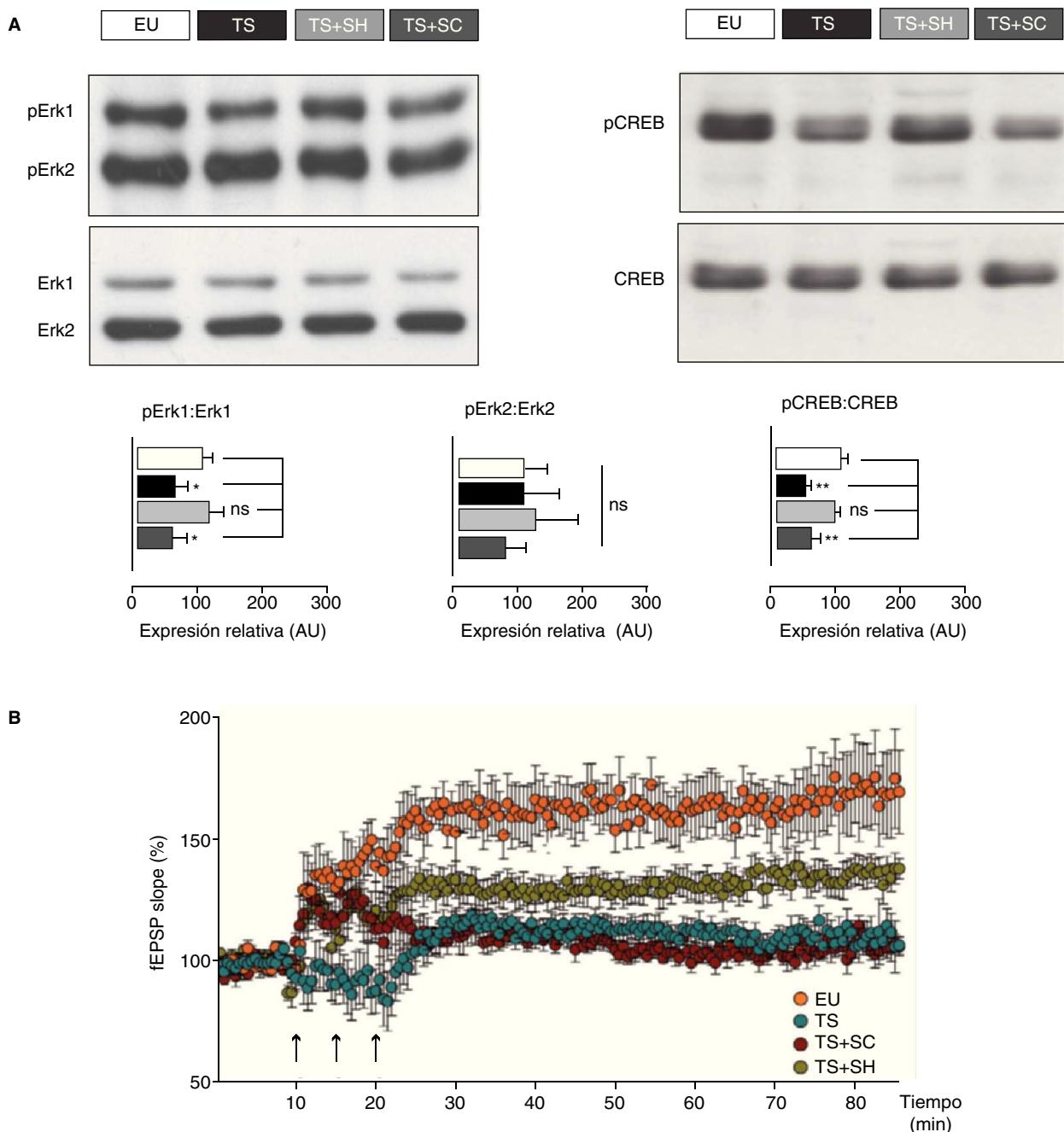


Figura 3 Efectos de la administración de AAV2/1-shDyrk1A sobre aspectos moleculares y electrofisiológicos de la función hipocámpica. A. Análisis por *Western blot* de la expresión de ERK1,2 y CREB, así como de sus formas fosforiladas (pERK1,2 y pCREB) en hipocampo de ratones euploides (EU), trisómicos (TS) y trisómicos inyectados con el virus shDyrk1A (SH) o scDyrk1A (SC). El histograma representa la relación entre la expresión de la forma activa (fosforilada) y la forma no fosforilada, de un promedio de tres experimentos independientes; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. B. Estudio electrofisiológico del potencial de campo postsináptico excitatorio (fEPSP) en condiciones basales y tras la inducción de LTP (3 pulsos de tetanización, indicados con las flechas, a intervalos de 5 minutos).

déficit en LTP de los ratones Ts65Dn¹². Nuestros experimentos confirmaron estas alteraciones, y en ellos pudimos observar que la administración del virus SH dio lugar a un rescate parcial en la LTP. Estos datos apoyaban el papel de Dyrk1A en cognición, y en este sentido decidimos estudiar el comportamiento de los animales ante una tarea que evalúa la función hipocámpica, como es el laberinto acuático de Morris, una

prueba conductual en la que se coloca de forma individual a los ratones en un piscina, y estos deben aprender a encontrar una plataforma para posarse. A lo largo de los días de realización, los ratones aprenden a ubicar la plataforma escondida mediante sus capacidades de orientación visoespacial, para la que es necesaria la función hipocámpica que permite realizar esta tarea de aprendizaje y memoria. Los ratones

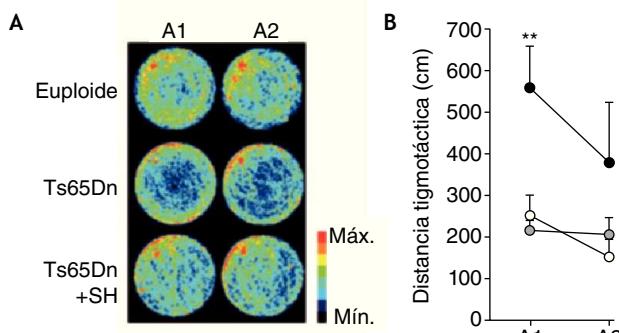


Figura 4 Análisis de la capacidad de aprendizaje y memoria hippocampo-dependiente en ratones tratados con AAV2/1-shDyrk1A. A. Mapa de densidad que representa la ocupación de los espacios en el laberinto acuático de Morris, en las dos primeras sesiones de adquisición de la tarea. B. Análisis del comportamiento tigmotáctico durante la tarea, a lo largo de las dos primeras sesiones del laberinto acuático. Los datos representan el valor medio \pm error estándar medio. $**p < 0,01$.

trisómicos presentan un defecto en la ejecución de la tarea que puede valorarse con la distancia que recorren hasta conseguir encontrar la plataforma. Al realizar este experimento, se observó también que el patrón de natación de los ratones

trisómicos era de tipo tigmotáctico, con un recorrido concentrado en la periferia de la piscina, y que representa una estrategia muy poco eficiente para encontrar la plataforma situada en la parte central de la piscina circular. En los ratones trisómicos tratados con el virus terapéutico, si bien continuaban presentando alteraciones importantes en la ejecución de la tarea, sí se observó una reducción en el patrón de navegación tigmotáctico, indicativo de una estrategia de navegación más eficiente, probablemente como consecuencia de una mejorada función hipocampica (fig. 4). En su conjunto, la estrategia desarrollada en el presente estudio nos permite proponer a Dyrk1A como una proteína clave en cognición y sugiere su potencial como diana terapéutica.

Impacto de la modulación de miRNA en ratones Ts65Dn

Los ratones Ts65Dn poseen en triple copia los miRNA miR-155 y miR-802, y en sus hipocampos se observa una sobreexpresión de estos (fig. 5A). Como consecuencia de ello puede haber genes que, al ser regulados por estos miRNA se hallen infraexpresados en la célula trisómica y sean en parte mediadores de algunas de las alteraciones celulares. En el presente proyecto diseñamos una estrategia de terapia génica dirigida a normalizar el contenido de miRNA para poder va-

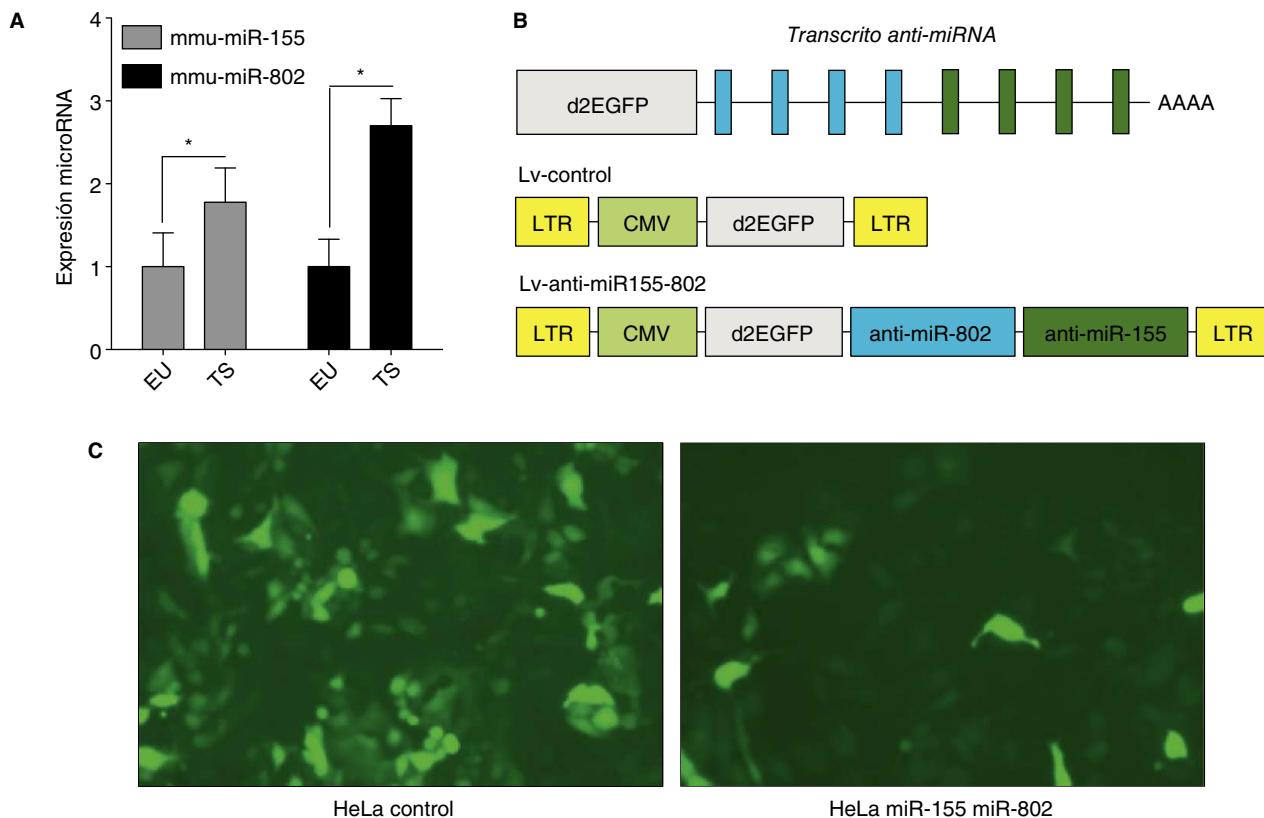


Figura 5 Validación de la capacidad de Lv-anti-miR155-802 de actuar como modulador de miR-155 y miR-802. A. Análisis de la expresión de miR-155 y miR-802 en hipocampos de ratones euploides (EU) y Ts65Dn (TS). Los datos representan el valor medio \pm error estándar medio $*p < 0,05$. B. Esquema del lentivirus Lv-anti-miR155-802 y el Lv-control. C. Análisis comparativo de la expresión de la proteína d2GFP en células HeLa control (bajo contenido en miRNA) y HeLa miR-155 miR-802 (alto contenido de ambos miRNA) transducidas con el Lv-anti-miR155-802 a 10 MOI.

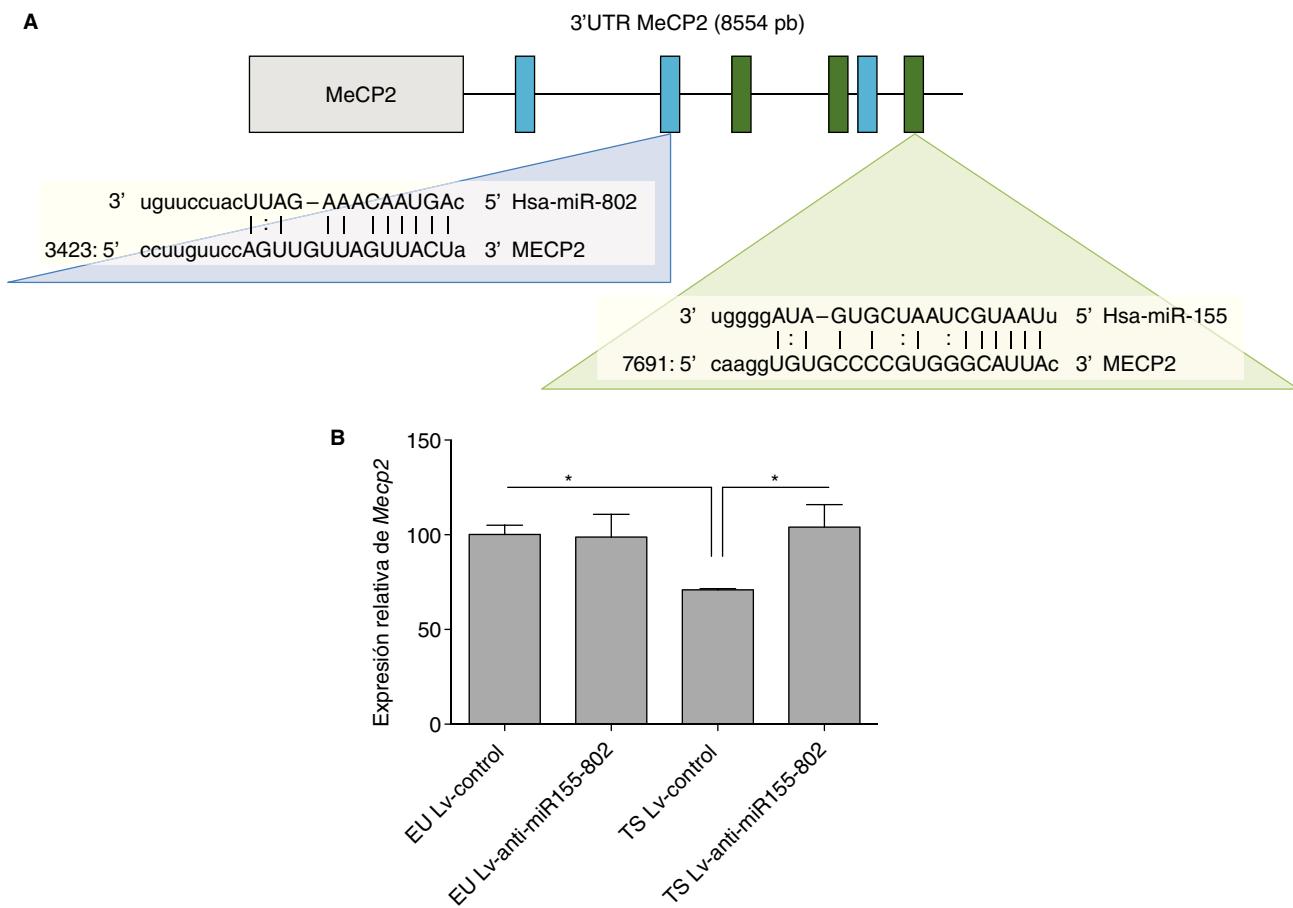


Figura 6 Efectos de la administración de Lv-anti-miR155-802 sobre la expresión de *Mecp2* en hipocampos inyectados de ratones Ts65Dn. A. Esquema de la región distal del gen *MeCP2* (región 3'UTR) donde se indican las secuencias de reconocimiento potenciales para miR-155 y miR-802. B. Análisis de la expresión de *Mecp2* mediante PCR cuantitativa (RT-qPCR) en el hipocampo de ratones euploides (EU), trisómicos (TS) y trisómicos inyectados con el virus Lv-anti-miR155-802 o Lv-control.

lorar su papel en los defectos cognitivos de ratones Ts65Dn. Generamos vectores lentivirales portadores del gen marcador de la d2EGFP (una forma de la proteína verde fluorescente) con secuencias adyacentes capaces de modular el contenido de miRNA (Lv-anti-miR155-802) (fig. 5B). Estas construcciones se diseñaron de manera que pudiera darse la unión de los miRNA miR-155 y miR-802 celulares a estas secuencias, reduciendo así su contenido y dando lugar a niveles de proteína d2EGFP fluctuantes en función del contenido de miR-155 y miR-802. Así, en presencia de los miRNA habría una baja expresión, mientras que esta sería elevada en su ausencia. Observamos de esta manera que la transducción de células con bajo contenido en miRNA mediante Lv-anti-miR155-802 daba lugar a una expresión elevada del transgen d2EGFP, mientras que la expresión era muy reducida en células con un alto contenido en miR-155 y miR-802 (fig. 5C). La inyección intra-hipocampal de los virus generados en el hipocampo de ratones Ts65Dn nos permitió valorar cambios en la expresión del gen *Mecp2*, un gen diana con secuencias de reconocimiento para ambos miRNA (fig. 6A). Observamos que, tal y como se había descrito, *Mecp2* se encuentra disminuido en hipocampo de ratones Ts65Dn¹³. La inyección de Lv-anti-miR155-802 en el hipocampo de ratones trisómicos rescató la expresión de *Mecp2* y alcanzó va-

lores similares a los de un ratón control (fig. 6B). Estos datos sugieren que los reducidos niveles de MeCP2 en cerebros de fetos con SD podría ser consecuencia de la sobreexpresión de miR-155 y miR-802. Defectos genéticos de pérdida de función de MeCP2 dan lugar al síndrome de Rett, una enfermedad que cursa con discapacidad intelectual. Ratones modelo para el defecto en *Mecp2* presentan alteraciones en plasticidad sináptica y en procesos de memoria y aprendizaje¹⁴. MeCP2 es un factor de transcripción de la familia de las proteínas de unión a citosinas metiladas en islas CpG y su actividad controla la expresión de numerosos genes. El conjunto de estos datos sugiere que, bien sea a través del control de la expresión de los miRNA (miR-155 y miR-802) o a través de la modulación directa de MeCP2, se podrían atenuar discapacidades cognitivas asociadas a estas patologías sindrómicas. En este sentido, se ha descrito que un suplemento nutricional de colina, en la etapa perinatal, en ratones deficientes en *Mecp2* provoca cambios neuroquímicos que preservan la integridad neuronal¹⁵. Recientemente se ha demostrado que una dieta con suplemento de colina a hembras Ts65Dn mejora el aprendizaje de ratones Ts65Dn¹⁶. Conjuntamente, estos datos permiten especular que la mejora en el aprendizaje de ratones Ts65Dn, adquirida tras el suplemento de colina, podría estar relacionada

con una recuperación de las funciones asociadas a los genes regulados por *Mecp2*. La estrategia de terapia génica desarrollada en el presente trabajo nos permite señalar a MeCP2 como una proteína importante en los procesos de memoria y aprendizaje en el SD y abre nuevas vías de intervención para la mejora de la discapacidad intelectual.

Conclusión

La calidad de vida de las personas con SD ha aumentado espectacularmente en los últimos años, gracias al esfuerzo de profesionales de muy diversos ámbitos y al apoyo e implicación de las familias. Sin embargo, la discapacidad intelectual continúa siendo una de las principales limitaciones, y por ello avanzar en la mejora de los aspectos cognitivos es uno de los principales retos para conseguir una integración óptima de estas personas en la sociedad. En este sentido, la identificación de genes clave (que codifican para proteínas o miRNA), cuya desregulación tiene un impacto negativo sobre la cognición, constituye un paso importante para avanzar en la identificación de potenciales terapias. En este contexto, nuestro trabajo propone la terapia génica como una estrategia de investigación que permite valorar la relevancia de modular dianas moleculares concretas para mejorar determinados aspectos de la capacidad intelectual.

Agradecimientos

A la Fundació Catalana Síndrome de Down, por la concesión del XIII Premio Ramon Trias Fargas a este trabajo. La financiación del trabajo ha sido posible gracias a las ayudas de la Fundación Jérôme Lejeune; Instituto de Salud Carlos III: FIS PI041559, PI 082038, CIBERER, IIS10/00014; CP10/00548; Generalitat de Catalunya: SGR091527, SGR091313; EU FP6-2005-LIFESCIHEALTH-6 ANEUPLOIDY no. 037627 y CureFXS ERare-EU/FIS PS09102673; y PEII10-0095-8727 de la Consejería de Educación Ciencia y Cultura (JCCM), BFU2011-26339/BFI Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) y INCRECyT (JCCM and PCYTA).

Bibliografía

1. Xu Y, Li W, Liu X, Chen H, Tan K, Chen Y, et al. Identification of dysregulated microRNAs in lymphocytes from children with Down syndrome. *Gene*. 2013;10:278-86.

2. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, Ferrua F, Cicalese MP, Baricordi C, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science*. 2013;341:1233151.
3. Biffi A, Montini E, Lorioli L, Cesani M, Fumagalli F, Plati T, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science*. 2013;341:1233158.
4. Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, Lim A, Picard C, Wang GP, et al. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. 2010;363:355-64.
5. Buning H. Gene therapy enters the pharma market: the short story of a long journey. *EMBO Mol Med*. 2013;5:1-3.
6. Dierssen M. Down syndrome: the brain in trisomic mode. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13:844-58.
7. Seregaza Z, Roubertoux PL, Jamon M, Soumireu-Mourat B. Mouse models of cognitive disorders in trisomy 21: a review. *Behav Genet*. 2006;36:387-404.
8. Altafaj X, Dierssen M, Baamonde C, Martí E, Visa J, Guimera J, et al. Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum Mol Genet*. 2001;10:1915-23.
9. Martí E, Altafaj X, Dierssen M, de la Luna S, Fotaki V, Alvarez M, et al. Dyrk1A expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system. *Brain Res*. 2003;964:250-63.
10. Martínez de Lagran M, Benavides-Piccione R, Ballesteros-Yanez I, Calvo M, Morales M, et al. Dyrk1A influences neuronal morphogenesis through regulation of cytoskeletal dynamics in mammalian cortical neurons. *Cereb Cortex*. 2012;22:2867-77.
11. Pons-Espinal M, Martínez de Lagran M, Dierssen M. Environmental enrichment rescues DYRK1A activity and hippocampal adult neurogenesis in TgDyrk1A. *Neurobiol Dis*. 2013;60C:18-31.
12. Siddiqui A, Lacroix T, Stasko MR, Scott-McKean JJ, Costa AC, Gardiner KJ. Molecular responses of the Ts65Dn and Ts1Cje mouse models of Down syndrome to MK-801. *Genes Brain Behav*. 2008;7:810-20.
13. Keck-Wherley J, Grover D, Bhattacharyya S, Xu X, Holman D, Lombardini ED, et al. Abnormal microRNA expression in Ts65Dn hippocampus and whole blood: contributions to Down syndrome phenotypes. *Dev Neurosci*. 2011;33:451-67.
14. Na ES, Nelson ED, Kavalali ET, Monteggia LM. The impact of MeCP2 loss- or gain-of-function on synaptic plasticity. *Neuropharmacology*. 2013;38:212-9.
15. Ward BC, Kolodny NH, Nag N, Berger-Sweeney JE. Neurochemical changes in a mouse model of Rett syndrome: changes over time and in response to perinatal choline nutritional supplementation. *J Neurochem*. 2009;108:361-71.
16. Velazquez R, Ash JA, Powers BE, Ginsberg SD, Strupp BJ, Mufson EJ. Maternal choline supplementation improves spatial learning and adult hippocampal neurogenesis in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neurobiol Dis*. 2013;58:92-101.