

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Desarrollo de péptidos neuroprotectores frente a la isquemia cerebral
basados en el receptor de glutamato de tipo NMDA y
su proteína interaccionante PSD-95**

TESIS DOCTORAL
Sara Ayuso Dolado
Madrid, 2017

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Desarrollo de péptidos neuroprotectores frente a la isquemia cerebral
basados en el receptor de glutamato de tipo NMDA y
su proteína interaccionante PSD-95**

TESIS DOCTORAL

Sara Ayuso Dolado

Licenciada en Biología y Bioquímica

Directora

Dra. Margarita Díaz-Guerra González

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid
CSIC-UAM



El Trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Fisiopatología Endocrina y del Sistema Nervioso del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid (CSIC-UAM), bajo la dirección de la Dra. Margarita Díaz-Guerra González.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una beca para la Formación de Personal Investigador (FPI, 2011-2015) así como a un contrato de titulado superior en actividades técnicas y profesionales financiado por el proyecto BFU2013-43808-R del Ministerio de Economía y Competitividad (2015-2016).

Dña. **Margarita Díaz-Guerra González**, Doctora en Ciencias e Investigador Científico del CSIC en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid (CSIC-UAM).

CERTIFICA:

Que Dña. **Sara Ayuso Dolado**, Licenciada en Biología y Bioquímica, ha realizado bajo su dirección el trabajo que lleva por título:

Desarrollo de péptidos neuroprotectores frente a la isquemia cerebral basados en el receptor de glutamato de tipo NMDA y su proteína interaccionante PSD-95

CONSIDERA, además, que el mencionado trabajo reúne la originalidad y la calidad científica requeridas para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en

Madrid, 7 de Marzo de 2017

Fdo.: Margarita Díaz-Guerra González
Investigador Científico del CSIC
Profesora Honoraria Dpto. Bioquímica UAM

Después de escalar una gran montaña, uno solo encuentra que hay muchas otras montañas por escalar.

Nelson Mandela

Necesito agradecer a mucha gente haber llegado hasta aquí y terminar esta Tesis.

En primer lugar, le agradezco a la Dra. Margarita Díaz-Guerra la oportunidad que me brindó allá por el 2008 para realizar la asignatura Bioquímica Experimental Avanzada en su laboratorio, el 2.7, que ha sido mi segunda casa estos años. Gracias por acogerme, enseñarme, animarme en muchas ocasiones y volver a contar conmigo para esta beca y este proyecto. Gracias por toda la ayuda en la corrección de esta Tesis, por la comprensión y apoyo en momentos difíciles durante estos años y por darme esa visión optimista en cada experimento que veía negro. He aprendido que hay que pelear cada experimento hasta el final, aunque flaqueen las fuerzas.

También quiero dar las gracias a la Dra. Ángeles Rodríguez Peña, por compartir amablemente laboratorio y por tanto y tanto material compartido durante estos años.

A la Dra. Lourdes Massieu Trigo, por el trabajo en común que desarrollamos durante estos años y también a Teresa Montiel Montes, por la realización del modelo *in vivo* de hipoglucemia. Ha sido un placer trabajar con vuestro laboratorio.

Al Dr. César Venero, por ayudarme a finalizar esta Tesis. Muchísimas gracias.

A los Drs. Jaime Renart y Jorge Martín por echarme una mano en alguna de las técnicas que realicé en este trabajo. Gracias por todo.

A los miembros del laboratorio 2.7, a los que estuvieron y a los que están. En primer lugar, a Óscar, por su infinita paciencia para enseñarme cuando llegué, por ayudarme siempre con una sonrisa, y por aprender de él a trabajar bien. A Ruth, por su ayuda en muchas ocasiones y a Sara (Sarona) por enseñarme y ayudarme cuando llegué con tanta paciencia, por su enorme calidad humana y su amistad y por sentar las bases de esta Tesis que hoy ve la luz. A Gema, mi compañera incansable con los *in vivo* en estos últimos meses. Muchas gracias por dejarte la piel ayudándome hasta el último momento y por impregnarme del optimismo perdido con los ratones. Por tu alegría y por hacerme ver las cosas siempre desde el punto de vista optimista. Gracias de verdad.

A todos los compañeros y amigos que pasaron algunas temporadas por aquí conmigo: Sara Mederos, Selene, Raquel, Dani, Gloria, Ale. Me quedo con tantos buenos momentos compartidos con cada uno de vosotros... Gracias por vuestra amistad y por ayudar a que este trabajo fuera para adelante. ¡Formamos un buen equipo!

Y sobre todo, agradecer sus incontables consejos, ayuda, ánimo... a mi amigo y compañero de batalla durante cuatro años, Gonzalo. Gracias por todo. Por ayudarme en infinitas ocasiones (incluso este último año contestándome dudas en la distancia). Echo la vista atrás y pienso que no me llevaría tan buenos recuer-

dos si no hubiéramos coincidido.

A Fabio, casi un miembro más del 2.7, por su amistad desde el principio.

Al laboratorio 2.4.2., a la Dra. Teresa Iglesias y a todos los integrantes pasados y presentes de su grupo: Celia, Lucia S. Ruiloba, Lucía García, Andrea, Julia, Ana... Gracias por dejarnos siempre esos microlitros de cualquier cosa que siempre faltan a última hora y por aquellos seminarios mixtos compartidos con tantas cabezas aportando ideas.

A los servicios del IIB, por haberme hecho más fácil realizar este trabajo. Gracias a todos: Microscopía, Almacén, Medios, Cultivos, Imagen, Animalario, Gestión de Residuos...

A todas aquellas personas que influyeron en mi formación y que hicieron que hoy haya llegado hasta aquí.

A mi familia. Gracias a todos por apoyarme. Por entenderme o intentarlo. A mi padre por animarme con tanta ilusión a que estudiara y me dedicara a esto que tanto me gustaba. Por todo lo que hiciste por mí y por ayudarme siempre, estés donde estés. A mi madre, porque gracias a ti me he dado cuenta de lo que realmente importa. Gracias por animarme tantas y tantas veces y por todos esos tappers de comida rica para que cogiera fuerzas. A mis hermanas por ayudarme siempre con mis agobios y hacerme ver que a veces soy un poco negativa. ¡Qué haría sin vosotras! Y a mi abuela, por acordarse siempre de mí y dejarme su casa para vivir todos estos años, en ningún sitio tan bien como aquí...

A Ancor. Por ser el bastón de apoyo en tantas ocasiones en las que me flaqueaban las fuerzas. Por esas reuniones en casa viendo Westerns y MTT's hasta las tantas. Y por esas discusiones eternas con la estadística, reconozco que eran para volverse loco. Gracias por estar aquí a mi lado siempre.

A César y Emma, por su apoyo y ánimo.

A mis amigas. A las de toda la vida: Irene y M^a Cruz. Por apoyarme, ayudarme y escucharme siempre. Por todo el ánimo que me dabais. A mis amigas de bioquímica, Teresa y Pamper, con las que me inicié en la poyata en tantas prácticas y con las que comparto tantos buenos recuerdos... A mis amigas masterizadas: Inma, Ale y Paula. Por esas quedadas entre semana para contarnos las penas y reírnos de ellas. ¡Quién mejor que vosotras para entender esto de hacer una Tesis!

Pues aquí está, esto es gracias a todos vosotros.

La activación fisiológica del receptor de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR) promueve la supervivencia neuronal y es crítica en procesos de plasticidad sináptica, memoria y aprendizaje. Por el contrario, su activación patológica conduce a una forma de muerte neuronal denominada excitotoxicidad, responsable principal de la degeneración neuronal secundaria propia de la isquemia cerebral y también asociada con hipoglucemia, enfermedades neurodegenerativas y otras patologías neurológicas. En excitotoxicidad, la pérdida de homeostasis del Ca^{2+} provoca la activación de la proteasa calpaína que, entre otros sustratos, procesa eficientemente las subunidades GluN2 del NMDAR y su proteína interaccionante PSD-95 (*postsynaptic density-95*). Este procesamiento genera subunidades GluN2A truncadas, deficientes en la señalización pro-supervivencia, y fragmentos estables de PSD-95 que desacoplan la red de interacciones proteicas mediada por esta proteína de andamiaje en la PSD. En esta Tesis, hemos caracterizado el procesamiento de PSD-95 en un modelo en rata de daño neuronal inducido por hipoglucemia, donde la excitotoxicidad y la activación de calpaína en corteza parietal y estriado originan fragmentos de PSD-95 en proporción a la severidad del daño. El procesamiento de PSD-95 en regiones interdominio discretas es muy similar al identificado en modelos celulares de excitotoxicidad y de isquemia permanente en ratón, donde la fragmentación es un proceso muy temprano. El procesamiento de GluN2A en el tejido infartado es igualmente temprano aunque mucho más complejo, dando lugar a un gran fragmento N-terminal muy estable y múltiples fragmentos intracelulares de baja estabilidad. Para interferir el procesamiento de GluN2A y PSD-95 en excitotoxicidad, hemos desarrollado diferentes péptidos conteniendo pequeñas secuencias de estas proteínas a continuación de una secuencia de la proteína Tat del VIH que confiere permeabilidad a la membrana plasmática y a la barrera hematoencefálica. Entre los péptidos diseñados para PSD-95, TP95₄₁₄ (aa. 414-427) previene eficientemente su degradación y mejora la supervivencia neuronal en excitotoxicidad *in vitro*, si bien no hemos podido demostrar todavía un efecto neuroprotector en isquemia. Por otra parte, TG2A₁₁₇₉ (aa. 1179-1192) interfiere el procesamiento de GluN2A inducido *in vitro* y preserva la activación de los factores de transcripción CREB y MEF2, que mantienen su actividad promotora sobre la transcripción de genes pro-supervivencia como el receptor de neurotrofinas TrkB, su ligando BDNF o las propias subunidades GluN2A y GluN1 del NMDAR. Los resultados muestran también que la susceptibilidad de GluN2A al procesamiento depende del estado de fosforilación de sus tirosinas y sugieren fuertemente que el efecto neuroprotector establecido para TG2A₁₁₇₉ es debido al mantenimiento específicamente de la fosforilación de los residuos Y1184 y/o Y1187. Estos aminoácidos tendrían, por tanto, un papel regulador clave sobre la estabilidad de GluN2A y su fosforilación disminuiría la susceptibilidad de la subunidad al procesamiento. Finalmente, una forma modificada de este péptido, MTG2A₁₁₇₉, que previsiblemente aumenta su estabilidad en plasma, tiene un efecto neuroprotector *in vivo* ya que reduce de manera estadísticamente significativa el volumen de tejido cerebral infartado y provoca una recuperación funcional en isquemia cerebral permanente. Estos resultados señalan la importancia de preservar la señalización fisiológica de los NMDARs formados por subunidades GluN2A en situaciones de daño cerebral y el enorme interés de esta proteína como diana terapéutica en neuroprotección.

Activation of the N-methyl-D-aspartate type of glutamate receptor (NMDAR) in physiological conditions promotes neuronal survival and is critical in processes such as synaptic plasticity, memory and learning. However, its pathological activation leads to a form of neuronal death known as excitotoxicity which is largely responsible for secondary neurodegeneration in stroke and is also associated with hypoglycemia, neurodegenerative diseases and other neurological pathologies. The loss of Ca^{2+} homeostasis during excitotoxicity causes calpain activation which, among other substrates, efficiently cleaves GluN2 subunits of NMDARs and their interacting protein PSD-95 (postsynaptic density-95). Such calpain processing generates truncated GluN2A subunits unable to maintain prosurvival signaling and stable PSD-95 fragments that provoke uncoupling of multiple proteins interacting with this scaffolding protein in the PSD. In this work, we have characterized PSD-95 proteolytic processing *in vivo* using a rat model of hypoglycemia where excitotoxicity and calpain activation in parietal cortex and striatum generate stable PSD-95 fragments in correlation to the severity of neuronal damage. PSD-95 processing within discrete interdomain regions is very similar to that identified in a cellular model of excitotoxicity or a mice model of permanent ischemia where PSD-95 cleavage is an early process along brain damage. GluN2A processing in the infarcted tissue is similarly an early process but far more complex, resulting in a very large stable N-terminal fragment and multiple intracellular fragments of reduced stability. To interfere GluN2A and PSD-95 processing induced by excitotoxicity, we have developed different peptides that contain short sequences of these proteins located after a HIV Tat sequence which confers the capability to cross the plasma membrane and the blood-brain barrier. Among the peptides designed for PSD-95, TP95₄₁₄ (aa. 414-427) can efficiently prevent this protein proteolytic degradation, a result correlating with enhancement of neuronal survival under *in vitro* excitotoxicity. However, we could not demonstrate so far a neuroprotective effect of TP95₄₁₄ in the ischemia model. On the other hand, peptide TG2A₁₁₇₉ (aa. 1179-1192) interferes *in vitro* induced GluN2A processing and preserves activation of the transcription factors CREB and MEF2, thus maintaining their promoter activity over the transcription of prosurvival genes, such as the neurotrophin receptor TrkB, its ligand BDNF, or the NMDAR subunits themselves, GluN2A and GluN1. In addition, our results demonstrate that GluN2A susceptibility to calpain processing depends on the phosphorylation status of the subunit tyrosines while strongly suggest that the neuroprotective effect of TG2A₁₁₇₉ could be due to the maintenance of the specific phosphorylation of GluN2A tyrosine residues Y1184 and/or Y1187. Therefore, these aminoacids could have a key regulatory role on GluN2A stability and their phosphorylation would decrease the subunit susceptibility to calpain processing. Finally, a modified form of this peptide, MTG2A₁₁₇₉, which presumably increases peptide stability in plasma, has also a neuroprotective effect *in vivo* since it significantly reduces the volume of infarcted brain tissue and causes functional recovery in a model of permanent cerebral ischemia. These results unveil the relevance of preserving physiological signaling of NMDARs containing GluN2A subunits after brain damage and the importance of this protein as a therapeutic target in neuroprotection.

ÍNDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
1. El ictus y la isquemia cerebral	9
1.1. El núcleo y la penumbra en el ictus isquémico	10
1.2. Fisiopatología de la isquemia cerebral	10
2. La excitotoxicidad neuronal	11
3. La calpaína y su función en condiciones de excitotoxicidad	12
4. La hipoglucemia, un trastorno relacionado con la excitotoxicidad	14
5. La familia de receptores de glutamato de tipo NMDA	15
5.1. Composición	15
5.2. Topología, propiedades y mecanismo molecular de activación del canal	16
5.3. Expresión temporal y regional en el SNC	17
5.4. Mecanismos de fosforilación	17
5.5. Vías de señalización en supervivencia y muerte neuronal	19
5.6. Relevancia funcional y alteraciones patológicas en el SNC	22
6. La densidad postsináptica y PSD-95	23
6.1. La proteína de andamiaje PSD-95: estructura y regulación	23
6.2. Interacciones proteicas y función de PSD-95	24
6.3. Implicación de PSD-95 en patologías del SNC	25
7. Transducción peptídica y neuroprotección	26
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. Reactivos	35
2. Tampones y soluciones	35
3. Péptidos sintéticos	36
4. Anticuerpos	37
5. Plásmidos y vectores lentivirales	38
6. Cultivos celulares	39
6.1. Cultivos primarios de neuronas corticales de rata	39
6.2. Cultivo de células HEK293T	40
7. Modelo animal de isquemia cerebral	40
8. Modelo animal de hipoglucemia	41
9. Estudio de la viabilidad neuronal mediante ensayo MTT	42
10. <i>Western blot</i> (WB)	42
11. Inmunoprecipitación (IP)	43
12. Inmunocitoquímica (ICQ)	44
13. Tinción de Nissl	44
14. Inmunohistoquímica (IHQ)	45
15. Tinción con Fluoro-Jade C (FJC)	45

16. Ensayo de la actividad de promotores	45
17. Transfección transitoria de células HEK293T	45
18. Ensayo de digestión <i>in vitro</i> con calpaína purificada	46
19. Evaluación del volumen de infarto	46
19.1. Evaluación mediante tinción con TTC	46
19.2. Evaluación mediante RMN	46
20. Evaluación de la coordinación motora y el balance	47
21. Análisis estadístico	47
RESULTADOS	49
1. Caracterización de la corregulación de la subunidad GluN2A del NMDAR y de la proteína de andamiaje PSD-95 en un modelo celular de excitotoxicidad neuronal	51
2. Validación de un modelo de isquemia focal permanente para la caracterización <i>in vivo</i> del procesamiento de GluN2A y PSD-95 y el análisis de las herramientas de neuroprotección desarrolladas	55
3. Caracterización del procesamiento de PSD-95 en el modelo <i>in vitro</i> de excitotoxicidad	57
4. Caracterización del procesamiento de PSD-95 en el modelo de isquemia cerebral permanente inducida por fototrombosis	60
5. Regulación de PSD-95 en un modelo de daño cerebral moderado inducido por hipoglucemia	62
6. Diseño de péptidos destinados a la interferencia del procesamiento de PSD-95 por calpaína inducido en condiciones de excitotoxicidad	63
6.1. Caracterización del efecto neuroprotector del péptido TP95 ₄₁₄ en el modelo celular de excitotoxicidad en relación a la dosis y duración del tratamiento	66
6.2. Estudio del mecanismo de acción del péptido TP95 ₄₁₄	69
7. Evaluación del efecto neuroprotector de TP95 ₄₁₄ en el modelo de isquemia cerebral permanente	71
8. Caracterización del procesamiento de GluN2A en el modelo de excitotoxicidad <i>in vitro</i>	73
9. Caracterización del procesamiento de GluN2A en el modelo de isquemia permanente	75
10. Efecto de la mutación de los aa. 942-944 y 1184-1187 de GluN2A sobre su sensibilidad al procesamiento por calpaína	77
11. Desarrollo de péptidos destinados a prevenir el procesamiento por calpaína de la subunidad GluN2A inducido en condiciones excitotóxicas	79
11.1. Caracterización del efecto neuroprotector de los péptidos TG2A ₉₃₆ y TG2A ₁₁₇₉ en el modelo celular de excitotoxicidad en relación a la dosis y duración del tratamiento	81
11.2. Estudio del mecanismo de acción del péptido TG2A ₁₁₇₉	85
11.2.1. Interdependencia de los mecanismos de acción de TG2A ₁₁₇₉ y calpaína	85
11.2.2. Efecto de TG2A ₁₁₇₉ sobre proteínas prosupervivencia neuronales diferentes de GluN2A	86
11.2.3. Vías de señalización implicadas en el efecto neuroprotector de TG2A ₁₁₇₉	87

11.2.4. Efecto de TG2A ₁₁₇₉ sobre la expresión de genes prosupervivencia CREB y MEF2 -dependientes	88
11.2.5. Efecto de TG2A ₁₁₇₉ sobre el estado de fosforilación de los residuos Y1184 y Y1187 de GluN2A y su susceptibilidad al procesamiento por calpaína en excitotoxicidad	90
12. Evaluación del efecto neuroprotector del péptido TG2A ₁₁₇₉ en un modelo de isquemia cerebral focal permanente	96
DISCUSIÓN	101
1. Procesamiento de GluN2A y PSD-95 en un modelo de isquemia cerebral permanente	103
2. Regulación de PSD-95 en hipoglucemia	104
3. Desarrollo de CPPs para interferir el procesamiento por calpaína de GluN2A y PSD-95 en el modelo de excitotoxicidad <i>in vitro</i>	105
3.1. Interferencia del procesamiento de PSD-95	106
3.2. Interferencia del procesamiento de GluN2A	108
3.2.1. Mecanismo de regulación del procesamiento por calpaína de GluN2A en excitotoxicidad	109
4. Evaluación de la eficacia neuroprotectora de TG2A ₁₁₇₉ y TP95 ₄₁₄ en isquemia cerebral	112
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	123
ANEXOS	153

CLAVE DE ABREVIATURAS

A β : péptido amiloide β	f45: fragmento de 45 kDa de PSD-95
ACV: accidente cerebrovascular	f50: fragmento de 50 kDa de PSD-95
AD: <i>Alzheimer disease</i>	f60: fragmento de 60 kDa de PSD-95
AID: <i>activity-regulated inhibitors of death</i>	FBS: suero fetal bovino
AKAP79/150: <i>A-kinase-anchoring protein 79/150</i>	fCt: fragmento C-terminal
AKT: <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>	FITC: <i>fluorescein isothiocyanate</i>
AMPA: receptor de glutamato de tipo α -amoni-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato	FL: <i>full-length</i>
AO: ácido okadaico	FMRP: <i>fragile X mental retardation protein</i>
AraC: citosina β -D-arabinofuranósido	FOXO: <i>forkhead box protein O</i>
BDNF: <i>brain-derived neurotrophic factor</i>	FSC: flujo sanguíneo cerebral
BDPs: <i>breakdown products</i>	FT: factor de transcripción
BHE: barrera hematoencefálica	FXS: <i>Fragile X syndrome</i>
[Ca ²⁺] _i : concentración intracelular de Ca ²⁺	Fyn: <i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn</i>
CaM: calmodulina	Glu: glutamato
CaMKK: <i>calcium-calmodulin-dependent kinase kinase</i>	GSK3 β : <i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
CaMKI: quinasa dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina I	GK: <i>guanylate kinase-like</i>
CaMKII: quinasa dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina II	HA: hemaglutinina
CaMKIV: quinasa dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina IV	HD: <i>Huntington disease</i>
Cdk5: <i>cyclin-dependent kinase 5</i>	HS: suero de caballo
CiIII: <i>calpain inhibitor III</i>	HSP90: <i>heat shock protein 90</i>
CKII: <i>casein kinase II</i>	ICQ: inmunocitoquímica
CPPs: <i>cell-penetrating peptides</i>	iGluRs: receptores ionotrópicos de glutamato
CRE: <i>cAMP/calcium response element</i>	IHQ: inmunohistoquímica
CREB: <i>cAMP response element-binding protein</i>	IP: inmunoprecipitación
Ct: C-terminal	i.v.: intravenoso
CTD: dominio C-terminal	JNK: <i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
DAPK: <i>death-associated protein kinase</i>	KAP: <i>Kidney androgen regulated protein</i>
DIV: día <i>in vitro</i>	Kidins220: <i>kinase D-interacting substrate of 220 kDa</i>
DL-AP5: ácido 2-amino-fosfo-pentanoico	Lck: <i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
DLG: <i>discs large homologue</i>	LT: lisado total
DMEM: <i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>	LTP: <i>long term potentiation</i>
DTT: ditioneitol	LTD: <i>long term depression</i>
Dyrk1a: <i>Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A</i>	Lyn: <i>tyrosine-protein kinase Lyn</i>
EDTA: ácido etilendiaminotetracético	MAGUK: <i>membrane-associated guanylate kinase</i>
EGTA: ácido etilen-bis (oxietileno nitrilo) tetracético	MCAO: <i>middle cerebral artery occlusion</i>
ERK1/2: <i>extracellular signal regulated kinase 1/2</i>	MEF2: <i>myocyte enhancer factor 2</i>
f35: fragmento de 35 kDa de PSD-95	MEK: <i>MAPK kinase/Erk kinase</i>
	MEM: <i>Minimum Essential Medium</i>
	mGluRs: receptores metabotrópicos de glutamato

MTT: 2-(4,5-dimetiltiazol-2-1)-2,5-difeniltetrazolio	PTEN: <i>Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten</i>
NFAT: <i>nuclear factor of activated T cells</i>	PTPs: fosfotirosina fosfatasas
NMDA: N-metil-D-aspartato	pTrkB: TrkB fosforilado
NMDAR: <i>NMDA receptor</i>	Pyk2: <i>proline-rich tyrosine kinase 2</i>
nNOS: <i>neuronal nitric oxide synthase</i>	RMN: Resonancia Magnética Nuclear
NO: <i>nitric oxide</i>	ROS: <i>reactive oxygen species</i>
NSE: enolasa específica neuronal	SAPK3: <i>stress-activated protein kinase 3</i>
Nt: N-terminal	Sbte: Sobrenadante
NTD: dominio N-terminal	SDS: dodecil sulfato sódico
pAKT: AKT fosforilado	SFKs: <i>Src family kinases</i>
pCREB: CREB fosforilado	SH3: <i>Src homology 3</i>
PD: <i>Parkinson disease</i>	SNC: Sistema Nervioso Central
PDZ: <i>Post-synaptic density-95/Disc large/Zonula occludens ligand</i>	Src: <i>v-src rous sarcoma viral oncogene homolog</i>
PDZ-L: <i>PDZ-ligand</i>	STEP: <i>striatal-enriched protein tyrosine phosphatase</i>
PHLPP1 α/β : <i>PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase α/β</i>	T/A: temperatura ambiente
PI: yoduro de propidio	TC: tomografía computerizada
PI3K: <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>	TM: dominio transmembrana
PIP ₃ : fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato	tPA: <i>tissue plasminogen activator</i>
PKA: <i>protein kinase A</i>	TrkB: <i>tropomyosin-related kinase B</i>
PKB: <i>protein kinase B</i>	TRPC6: <i>canonical transient receptor potential channel 6</i>
PKC: <i>protein kinase C</i>	TTC: cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio
PSD: densidad postsináptica	VIH: virus de la inmunodeficiencia humana
PSD-95: <i>postsynaptic density-95</i>	WB: <i>Western Blot</i>
	Yes: <i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase Yes</i>

INTRODUCCIÓN

1. El ictus y la isquemia cerebral

El ictus o accidente cerebrovascular (ACV) es un trastorno que afecta a un área del parénquima cerebral como consecuencia de una interrupción abrupta en el flujo sanguíneo cerebral (FSC) con sintomatología variable dependiendo de la región específicamente afectada (Gunel and Lifton, 1996). Constituye la segunda causa de muerte a nivel mundial y, siendo la edad uno de los principales factores de riesgo, se prevé un aumento futuro en el número de casos. Entre los supervivientes, el ictus tiene consecuencias a largo plazo ya que constituye la primera causa de incapacidad en adultos y la segunda de demencia tras la enfermedad de Alzheimer (AD). Debido a su elevada prevalencia, el ictus ocasiona una enorme carga social y económica, por lo que su investigación debería ser prioritaria.

Los ictus pueden tener un origen hemorrágico si son producidos por la rotura de un vaso sanguíneo, aunque la gran mayoría son de tipo isquémico (80-90%) y están ocasionados por una obstrucción en la vasculatura que reduce el aporte sanguíneo adecuado a una región del cerebro (**Fig. I1**). La interrupción del FSC puede ser permanente, si no se resuelve espontáneamente o por acción terapéutica, o transitoria. El daño cerebral producido puede variar dependiendo de la rapidez en el diagnóstico y tratamiento, el tipo de ictus y la evolución clínica del paciente. Una complicación importante es que las técnicas de imagen utilizadas de manera estándar en su diagnóstico, tomografía computarizada (TC) o resonancia magnética nuclear (RMN), no son accesibles de manera inmediata para todos los pacientes. En cuanto al tratamiento, la única terapia farmacológica aprobada para la isquemia aguda es la trombólisis con el activador tisular del plasminógeno (tPA), que ayuda a disolver rápidamente el coágulo que obstruye la arteria (del Zoppo et al., 1992). Sin embargo, criterios de elegibilidad estrictos, incluyendo una ventana terapéutica limitada a 4.5 h después de la aparición de los síntomas y la exclusión de condiciones médicas comunes, restringen el tratamiento a menos del 5% de los pacientes (Hacke and Lichy, 2008). Además, la recanalización de la arteria por tPA puede tener complicaciones hemorrágicas y agravar la situación en pacientes con ictus hemorrágico. En las últimas décadas se ha tratado de desarrollar terapias neuroprotectoras frente al ictus y, aunque los estudios preclínicos iniciales demostraron la eficacia de numerosos fármacos, los ensayos clínicos posteriores resultaron frustrantes y ninguno de los agentes desarrollados resultó eficaz. Por tanto, es necesario desarrollar nuevos tratamientos frente al ictus que sean eficientes, seguros y tengan ventanas terapéuticas más amplias que el tPA.

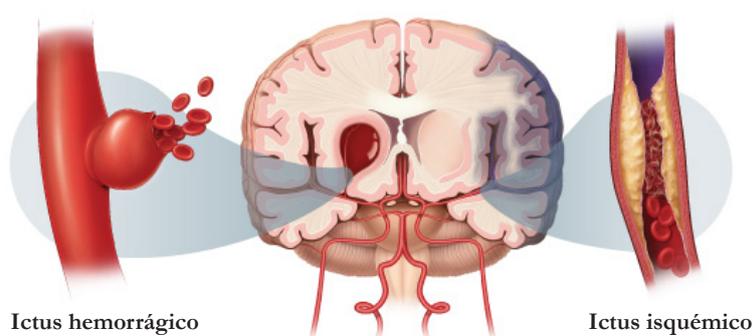


Fig. I1. Tipos de ictus según su origen. El ictus se origina como consecuencia de una interrupción brusca en el aporte sanguíneo a una región del cerebro, lo que provoca una alteración en la función del mismo. Existen dos tipos de ictus: hemorrágico, si es producido por la ruptura de un vaso sanguíneo cerebral; o isquémico, si se origina por la falta de riego en una región del cerebro debido a la presencia de un trombo o placa aterosclerótica. Este último tipo es mayoritario y conforma el 80-90% de los casos. Tomada de www.fescenter.org

1.1. El núcleo y la penumbra en el ictus isquémico

La disminución del FSC y, por tanto, de oxígeno y glucosa, afecta al tejido cerebral dependiendo de su intensidad y permite distinguir una región central necrótica, denominada núcleo del infarto, rodeada de un área de penumbra. En ella, el FSC está suficientemente reducido como para causar hipoxia y detener la función fisiológica, pero no un fallo irreversible en el metabolismo energético y necrosis celular (Astrup et al., 1981; Ginsberg, 2003). Así, la penumbra isquémica constituye una zona reversiblemente dañada que presenta una gran relevancia desde el punto de vista clínico ya que es la diana de las terapias en desarrollo para la neuroprotección frente al ictus (Fisher, 1997). Sin embargo, este área evoluciona con el tiempo y, si el FSC no se recupera, sufre procesos de muerte neuronal secundaria que causan una expansión gradual del infarto y esta zona potencialmente recuperable acaba desapareciendo (**Fig. I2**). Lógicamente, existe un gran interés por caracterizar los mecanismos moleculares subyacentes a esta muerte neuronal secundaria.

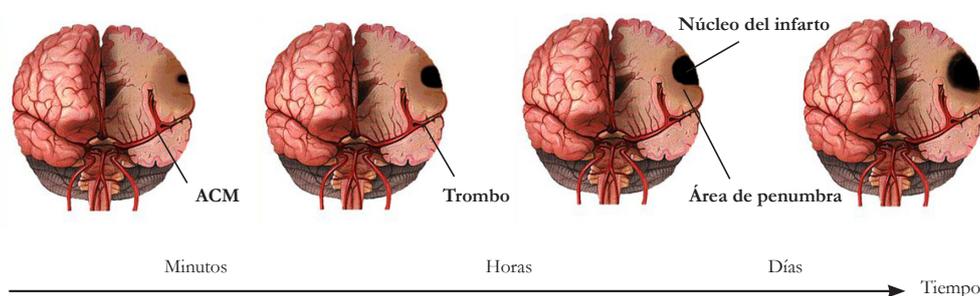


Fig. I2. Evolución del infarto en isquemia cerebral. La reducción del flujo sanguíneo cerebral (FSC) por oclusión, por ejemplo, de la arteria cerebral media (ACM) por un trombo produce un daño diferencial en el tejido afectado que permite distinguir una región central necrótica o núcleo del infarto, rodeada por el área de penumbra, caracterizada por ser funcionalmente silente pero intacta desde el punto de vista estructural. Este área de penumbra no se encuentra dañada de manera irreversible y, por ello, es la diana de las estrategias terapéuticas en desarrollo frente al ictus. Sin embargo, si no se recupera el FSC en un periodo definido de tiempo denominado ventana terapéutica, esta región puede sufrir un proceso de degeneración neuronal retardada que da lugar a la expansión gradual del núcleo del infarto hacia la zona de penumbra isquémica. Adaptado de Dirnagl et al. (1999).

1.2. Fisiopatología de la isquemia cerebral

El daño cerebral tras la isquemia es el resultado de una serie compleja de eventos fisiopatológicos que evolucionan en espacio y tiempo. Los principales mecanismos patogénicos de esta cascada incluyen la excitotoxicidad, las despolarizaciones peri-infarto, la inflamación y la muerte celular programada (**Fig. I3**). A consecuencia de la lisis de las neuronas del núcleo del infarto, el neurotransmisor excitatorio glutamato es liberado al espacio extracelular. Al tiempo, las células del área de penumbra reciben un FSC disminuido que les impide generar suficiente ATP para mantener el gradiente iónico, indispensable para la recaptación de glutamato por sus transportadores (Zerangue and Kavanaugh, 1996). La acumulación de glutamato en el espacio extracelular produce una sobreactivación de sus receptores que desencadena el proceso de excitotoxicidad (Rothman and Olney, 1986), cuyas consecuencias detallaremos más adelante. Por otra parte, debido al déficit energético y la liberación de K^+ y glutamato al espacio extracelular, neuronas y glía en la zona isquémica se despolarizan. Las células del núcleo del infarto pueden sufrir despolarizaciones anóxicas y no volver a repolarizarse, mientras que en la penumbra ocurren despolarizaciones y repolarizaciones repetitivas, denominadas despolarizaciones peri-infarto, que provocan la expansión del daño isquémico (Hossmann, 1996).

La inflamación tras la isquemia contribuye de manera importante al daño cerebral. La activación de segundos mensajeros mediada por el Ca^{2+} , el aumento en especies reactivas de oxígeno (ROS) y la hipoxia

provocan la expresión de genes proinflamatorios en las células dañadas del núcleo del infarto (Rothwell and Hopkins, 1995). Además, la expresión en la superficie de las células endoteliales de moléculas de adhesión permite la interacción con receptores de la superficie de los neutrófilos que se adhieren al endotelio, cruzan la pared vascular y entran en el parénquima cerebral. Junto con ellos, migran también macrófagos y monocitos (revisado en Iadecola, 1997). Además, las células cerebrales también intervienen en la respuesta inflamatoria y, 4-6 h tras la isquemia, los astrocitos se hipertrofian y la microglía retrae sus procesos y adquiere una morfología ameboides típica de su estado activado. Las células cerebrales afectadas por la sobreactivación de los receptores de glutamato, el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), la formación de ROS, o el daño mitocondrial y al ADN, pueden morir por necrosis o apoptosis dependiendo de la naturaleza e intensidad del estímulo y el tipo de célula. La necrosis es predominante en el núcleo del infarto, mientras que en la penumbra tienen lugar fundamentalmente procesos apoptóticos (revisado en Dirnagl et al., 1999).

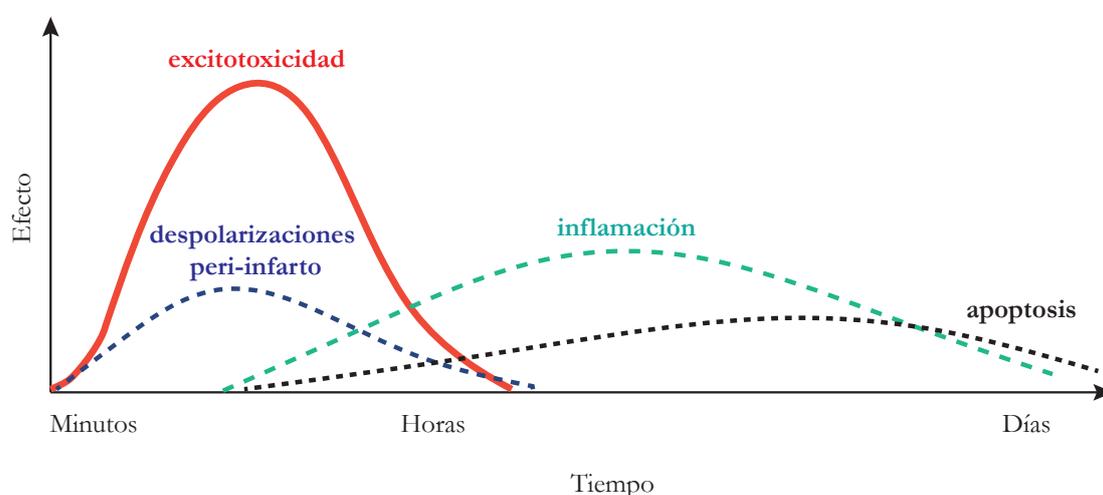


Fig. 13. Cascada de eventos patogénicos en la isquemia cerebral. De manera temprana tras el ictus, la excitotoxicidad puede dañar de manera letal neuronas y glía. La excitotoxicidad además provoca una serie de eventos que contribuyen a la muerte del tejido isquémico, tales como las despolarizaciones peri-infarto, y más tarde, inflamación y muerte celular programada. El eje de abscisas muestra la evolución temporal de estos eventos en el tiempo y el eje de ordenadas indica el impacto sobre el daño final producido. Adaptado de Dirnagl et al. (1999).

2. La excitotoxicidad neuronal

El mecanismo fundamental en la muerte neuronal secundaria asociada al ictus es la excitotoxicidad (Olney, 1986), proceso inducido por el aumento de glutamato en el espacio extracelular (Choi and Rothman, 1990) y la consecuente sobreactivación de sus receptores ionotrópicos (iGluRs), fundamentalmente los de tipo N-metil-D-aspartato (NMDARs). Estos son canales iónicos altamente permeables al Ca^{2+} cuya sobreactivación da lugar al incremento inicial de este ion en el citosol y la alteración de la maquinaria celular responsable de su homeostasis. Así, proteínas asociadas a la membrana como el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y diferentes canales iónicos [panexina 1 , sensibles a ácido, y TRPC6 (*canonical transient receptor potential channel-6*)] pierden su regulación normal y contribuyen a la sobrecarga de Ca^{2+} en fases tardías de la excitotoxicidad (Bano et al., 2005; Du et al., 2010; Szydłowska and Tymianski, 2010). Además, la sobreactivación también permite la entrada de Na^+ y Cl^- en las neuronas a través de canales para iones monovalentes, como los receptores de glutamato de tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA), seguida pasivamente por el flujo de agua causando edema intracelular. El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dispara una serie

de actividades enzimáticas, como caspasas, calpaínas, lipasas o nucleasas (Ankarcrona et al., 1995) que, en conjunto, median la muerte celular (Dirnagl et al., 1999; Lo et al., 2003). Las ROS actúan también como moléculas señalizadoras que provocan inflamación y apoptosis mientras que el óxido nítrico (NO), producido por la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), reacciona con el anión superóxido y forma peroxinitrito que produce daño tisular (Beckman and Koppenol, 1996; Iadecola, 1997). Por otra parte, la mitocondria, fuente importante de ROS, está afectada por la alteración de su membrana interna mediada por radicales libres y la oxidación de proteínas mediadoras del transporte de electrones, el bombeo de protones y la producción de ATP (Dugan and Choi, 1994). Además, el citocromo c es liberado de la mitocondria y desencadena la apoptosis (Fujimura et al., 1998).

El proceso excitotóxico, central en el ictus, está asociado con otras enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC) como la hipoglucemia, la epilepsia o el trauma agudo (Choi, 1988; Choi and Rothman, 1990; Meldrum, 1993), así como con enfermedades neurodegenerativas crónicas como las enfermedades de Parkinson (PD), Huntington (HD), AD, esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica (Beal, 1998; Gonsette, 2008; Hynd et al., 2004; Tabrizi et al., 1999; Van Den Bosch et al., 2006). Por ello, la investigación sobre los mecanismos moleculares del proceso excitotóxico y la búsqueda de herramientas de neuroprotección basadas en ellos adquiere gran importancia por su posible utilidad en el tratamiento de todas esta familia de patologías asociadas con la excitotoxicidad.

3. La calpaína y su función en condiciones de excitotoxicidad

Las calpaínas son un grupo de cisteín-proteasas Ca^{2+} -dependientes presentes en diferentes compartimentos neuronales (Goll et al., 2003). De entre los 15 miembros identificados en humanos, μ -calpaína y m -calpaína (conocidas también como calpaína I y calpaína II, respectivamente), se expresan abundantemente en el SNC (Goll et al., 2003) estando su actividad catalítica modulada por su interacción con una subunidad reguladora (revisado en Campbell and Davies, 2012; Curcio et al., 2016). En condiciones fisiológicas, regulan procesos tan importantes como la regeneración tisular, diferenciación celular, expresión génica, transducción de señales, plasticidad sináptica o apoptosis (Liu et al., 2008; Ono and Sorimachi, 2012; Salazar et al., 2016). En condiciones patológicas, las funciones de calpaína I y II parecen ser diferentes y depender de su localización y asociación con los NMDARs. Así, mientras que calpaína I se activa a través de la estimulación de los NMDARs conformados por subunidades GluN2A, como veremos fundamentalmente sinápticos (Tovar and Westbrook, 1999), calpaína II responde a la estimulación de aquellos formados por subunidades GluN2B (Wang et al., 2013). Cabe resaltar que los NMDARs conformados por GluN2A, la proteína de andamiaje PSD-95 (*postsynaptic density-95*) y calpaína I forman complejos donde la proteasa es reclutada por la actividad sináptica del NMDAR (revisado en Baudry and Bi, 2016; Wang et al., 2013). La activación de la calpaína I resulta neuroprotectora gracias a la degradación selectiva de las fosfatasa PHLPP α (*PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase a*) y PHLPP β (*PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase β*), que participan en la defosforilación e inactivación de un efector crítico en la supervivencia neuronal como es la proteína AKT (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*). Por el contrario, la activación de la calpaína II contribuye a la muerte neuronal a través de la degradación de la tirosina fosfatasa STEP (*striatal-enriched protein tyrosine phosphatase*), que impide la defosforilación e inactivación de la proteína promueve p38 (Deb

et al., 2013; Xu et al., 2009). Sin embargo, es necesario continuar profundizando en la función de estas dos isoformas en excitotoxicidad ya que, por ejemplo, calpaína I puede también participar en una fase tardía de muerte neuronal provocada por disfunción mitocondrial (Yamada et al., 2012).

El análisis de la estructura primaria de los sustratos de calpaína no permite establecer una secuencia específica de procesamiento en los mismos (DuVerle et al., 2011; Fan et al., 2013; Tompa et al., 2004). Se ha sugerido que esta proteasa reconoce preferentemente estructuras tridimensionales no bien definidas en sus sustratos (Sorimachi et al., 2012), siendo frecuente el procesamiento en regiones que separan distintos dominios proteicos (Tompa et al., 2004). Entre sus sustratos se encuentran diversas proteínas de membrana e intracelulares como los AMPARs (Bi et al., 1998a), cuyo procesamiento interrumpe su acoplamiento a la vía de señalización prosupervivencia de PI3K (*Phosphoinositol 3-kinase*)/AKT (Xu et al., 2007), o las subunidades GluN2A del NMDAR, que una vez procesadas desacoplan los NMDARs sinápticos de la expresión de genes prosupervivencia mediada por el factor de transcripción (FT) CREB (*cAMP response element-binding protein*) (Gascon et al., 2008b). Otros sustratos importantes son la proteína de la densidad postsináptica (PSD) PSD-95 (Gascon et al., 2008b) y los FTs prosupervivencia CREB (Jin et al., 2013; Tan et al., 2012) y Mef2D (*Myocyte enhancer factor 2D*) (Wei et al., 2012), cuyo procesamiento contribuye a la muerte neuronal en excitotoxicidad. Adicionalmente, calpaína contribuye al proceso de muerte en isquemia mediante el procesamiento de diversas proteínas implicadas en el control de la homeostasis del Ca^{2+} , cuya proteólisis contribuye a mantener elevados los niveles intracelulares de este ion. Entre ellas están la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (Pottorf et al., 2006), el intercambiador de Na^{+}/K^{+} (Bano et al., 2005), el canal de Ca^{2+} de tipo L (Hell et al., 1996), la quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina IV (CaMKIV) (Tremper-Wells and Vallano, 2005), el canal TRPC6 (Du et al., 2010) y la fosfatasa calcineurina (Wu et al., 2004). También es muy importante la actividad de calpaína sobre Src (*v-src rous sarcoma viral oncogene homolog*), una tirosina quinasa crítica en la regulación de la actividad del NMDAR y en la supervivencia neuronal en condiciones fisiológicas (Hossain et al., 2013). Este procesamiento genera un fragmento tóxico de Src que dirige la muerte neuronal a través de la inactivación de vía de AKT (Iqbal Hossain et al., 2015). Finalmente, otro importante sustrato de calpaína es la proteína nNOS (160 kDa), implicada en la síntesis de NO, molécula que exacerba el daño neuronal (Hajimohammadreza et al., 1997; Zhou and Zhu, 2009). Sin embargo, la susceptibilidad *in vivo* de nNOS al procesamiento por calpaína está modulada por la formación de complejos con la chaperona HSP90 (*heat shock protein 90*). Esta proteína es muy abundante en cerebro y limita el procesamiento de nNOS a una forma truncada de 130 kDa que conserva su actividad catalítica en condiciones de activación de la calpaína (Averna et al., 2008). Otro mecanismo frecuente de modulación de la actividad de calpaína sobre sus sustratos consiste en la fosforilación de éstos, proceso que puede aumentar su susceptibilidad al procesamiento, como en el caso de GluN2B (Wu et al., 2007), las subunidades GluR1 de los AMPARs (Yuen et al., 2007) o la proteína KAP (*Kidney androgen regulated protein*, Tornavaca et al., 2011), o hacerles más resistentes, como ocurre con la espectrina (Nedrelew et al., 2003; Nicolas et al., 2002), GSK3 β (*Glycogen synthase kinase 3 beta*, Ma et al., 2012) y Kidins220 (*kinase D-interacting substrate of 220 kDa*, Lopez-Menendez et al., 2013).

Aunque algunos investigadores han postulado que el procesamiento por calpaína de sus sustratos en situaciones de excitotoxicidad e isquemia cerebral tendría un efecto neuroprotector, otros muchos datos muestran que la inhibición de esta proteasa es capaz de reducir significativamente la muerte celular (Ray

and Banik, 2003; Wang et al., 2013). Dado el papel central de la activación de calpaína en la patogénesis de multitud de enfermedades neurológicas, la inhibición de esta proteasa podría constituir por tanto una diana de neuroprotección. Sin embargo, como se mencionó, la actividad de calpaína es necesaria para el funcionamiento normal de las células y su inhibición tendría potencialmente efectos deletéreos en las mismas. Por ello, una estrategia muy novedosa y prometedora de neuroprotección para las patologías asociadas con excitotoxicidad consiste en el desarrollo de inhibidores que impidan las acciones patológicas de la calpaína sobre determinados sustratos, pero preservando los aspectos fisiológicos de su función.

4. La hipoglucemia, un trastorno asociado con la excitotoxicidad

La concentración fisiológica de glucosa sanguínea en humanos se mantiene en el rango de 80-90 mg/dl a través de mecanismos de tipo endocrino altamente regulados. Diversas causas, incluyendo defectos en estos mecanismos de control, pueden producir fluctuaciones en la concentración de glucosa. La hipoglucemia puede presentarse de forma crónica en pacientes con alteraciones hormonales o como una complicación grave en la terapia con insulina en pacientes diabéticos, cuando estos exceden su dosis de administración. De hecho, la hipoglucemia severa es frecuente en pacientes con diabetes *mellitus* tipo I y tipo II avanzada (Cryer, 2004) y puede llegar a tener consecuencias funcionales. Un estado de hipoglucemia moderada afecta a los procesos de memoria (Sommerfield et al., 2003) mientras que los episodios repetidos de hipoglucemia severa ocasionan deterioro cognitivo en niños (Naguib et al., 2009) y adultos (Carroll et al., 2003).

La disminución de la concentración de la glucosa por debajo de 20 mg/dl produce un cese de la actividad eléctrica cerebral, conocido como coma hipoglucémico o estado isoelectrico. Debido a la alta dependencia de glucosa por parte del cerebro, la hipoglucemia ocasiona daño neuronal, siendo la corteza cerebral, el hipocampo y el estriado las zonas más vulnerables (Auer et al., 1984b). Además, el nivel de daño en estas regiones está estrechamente relacionado con la duración del periodo isoelectrico (Auer et al., 1984a). Muchas funciones celulares se alteran debido al déficit energético como, por ejemplo, el mantenimiento de los gradientes iónicos, la liberación y recaptura de neurotransmisores, la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ y la función mitocondrial (Haces and Massieu, 2005). Múltiples factores contribuyen a la muerte neuronal hipoglucémica (revisado en Languren et al., 2013), entre ellos el estrés oxidativo (Paramo et al., 2010), la respuesta inflamatoria (Won et al., 2012) y la excitotoxicidad (Sandberg et al., 1986). En este sentido, se ha sugerido que el daño neuronal observado es el resultado de un proceso excitotóxico iniciado por la liberación y recaptación defectivas de glutamato y aspartato al comienzo del periodo isoelectrico (Sandberg et al., 1986), demostrándose que la administración de antagonistas del NMDAR previene la muerte neuronal por hipoglucemia *in vivo* (Wieloch, 1985) incluso después del periodo isoelectrico (Nellgard and Wieloch, 1992). Además, tras el coma hipoglucémico, se produce la activación de la calpaína (Ferrand-Drake et al., 2003) que, en modelos de privación de glucosa, está mediada por la producción de ROS (Paramo et al., 2013) de manera dependiente de la activación de los NMDARs (Paramo et al., 2010). Estas evidencias sugieren que la acumulación de glutamato y la activación de sus receptores juega un papel importante y temprano en el desarrollo del daño hipoglucémico en regiones selectivamente vulnerables del cerebro.

5. La familia de receptores de glutamato de tipo NMDA

El glutamato media la gran mayoría de la neurotransmisión excitatoria en el cerebro y la médula espinal actuando sobre varios receptores de membrana, clasificados en dos grandes familias de acuerdo al mecanismo de transducción de la señal empleado:

- La familia de receptores metabotrópicos (mGluRs) presenta 8 subtipos que son proteínas con siete dominios transmembrana (TM) acoplados a proteínas G heterotriméricas. Modulan la transmisión sináptica mediante la activación de cascadas de señalización intracelular dependientes de segundos mensajeros (Schoepp et al., 1990; Sugiyama et al., 1987).
- La familia de los iGluRs son canales iónicos acoplados a ligando, responsables de la hiperpolarización y despolarización local de la membrana plasmática neuronal en las sinapsis excitatorias. Se clasifican en tres subtipos, atendiendo a su afinidad selectiva por agonistas sintéticos y sus características electrofisiológicas (Michaelis, 1998): AMPARs, receptores de tipo kainato y NMDARs. Los dos primeros tipos presentan cinéticas de activación rápidas y son permeables a Na^+ , K^+ y en menor medida a Ca^{2+} (Hollmann and Heinemann, 1994).

Los NMDARs exhiben propiedades específicas que los distinguen del resto de iGluRs: desempeñan un papel crucial en la comunicación neuronal y están implicados en procesos como la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria (Dingledine et al., 1999). Consecuentemente, la alteración de su funcionamiento fisiológico, que como vimos ocurre durante el proceso de excitotoxicidad, contribuye de manera muy importante al desarrollo de una gran variedad de enfermedades neurológicas y psiquiátricas.

5.1. Composición

Existen tres familias de subunidades (Monyer et al., 1992; Mori and Mishina, 1995; Moriyoshi et al., 1991): GluN1, GluN2 y GluN3. La subunidad GluN1 está codificada por un solo gen que da lugar a ocho isoformas distintas (GluN1-1a a 4a y GluN1-1b a 4b) a través de mecanismos de *splicing* (Dingledine et al., 1999). La familia GluN2 está compuesta por cuatro miembros (GluN2A-D) codificados por cuatro genes distintos y la familia GluN3 contiene dos miembros (GluN3A y B) codificados por dos genes. Estos receptores son complejos heterotetraméricos, generalmente formados por dos subunidades GluN1, componente obligatorio del NMDAR, y dos GluN2. El dímero GluN2 puede estar formado por dos proteínas iguales o diferentes entre sí, generando receptores heterodiméricos (GluN1/GluN2A o GluN1/GluN2B) o heterotriméricos (GluN1/GluN2A/GluN2B). Por su parte, los receptores que incorporan subunidades GluN3 pueden ser también diheteroméricos (GluN1/GluN3) o triheteroméricos (GluN1/GluN2/GluN3) (Traynelis et al., 2010). Los NMDARs formados por subunidades GluN3 aparecen en algunos tipos celulares particulares en determinadas etapas del desarrollo (revisado en Perez-Otano et al., 2016). Particularmente, GluN3A puede actuar como una subunidad reguladora y afecta a la expresión en superficie del receptor, reduciendo su permeabilidad al Ca^{2+} y el flujo de la corriente a través del canal (Perez-Otano et al., 2001). Además, se ha descrito un importante papel de estas subunidades en la maduración sináptica y en el marcaje de sinapsis para su eliminación (Perez-Otano et al., 2016). En definitiva, la diversidad de subunidades permite una gran variedad de posibilidades de ensamblaje que da lugar a muchos NMDARs diferentes con propiedades biofísicas, farmacológicas y de señalización propias (revisado en Sanz-Clemente et al., 2013).

5.2. Topología, propiedades y mecanismo molecular de activación del canal

Los NMDARs son proteínas integrales de membrana compuestas, como señalamos anteriormente, por cuatro subunidades que se disponen conformando un canal iónico para Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Comparten con el resto de iGluRs una organización modular, donde cada subunidad consiste en cuatro módulos discretos o dominios (**Fig. I4**) (Paoletti and Neyton, 2007). En la región extracelular se encuentra el dominio N-terminal (NTD), responsable del ensamblaje de las subunidades, y el dominio de unión al agonista, glicina o D-serina en las subunidades GluN1 y GluN3 y glutamato o su análogo NMDA en las subunidades GluN2. El dominio de membrana está formado por tres segmentos transmembrana (TMI, TMIII y TMIV) y un segmento en forma de horquilla (TMII) que confiere la selectividad iónica al canal. Finalmente, el dominio C-terminal (CTD), que se encuentra orientado hacia el interior celular, presenta una longitud variable en función de la subunidad y está implicado en el tráfico del receptor, su anclaje al citoesqueleto celular y la unión a complejos de señalización (Bolton et al., 2000; Lau and Zukin, 2007; Ryan et al., 2008). Esta región contiene, particularmente en el caso de las subunidades GluN2A y GluN2B, un gran número de sitios de fosforilación que pueden alterar la actividad del receptor y su localización celular (Salter and Kalia, 2004).

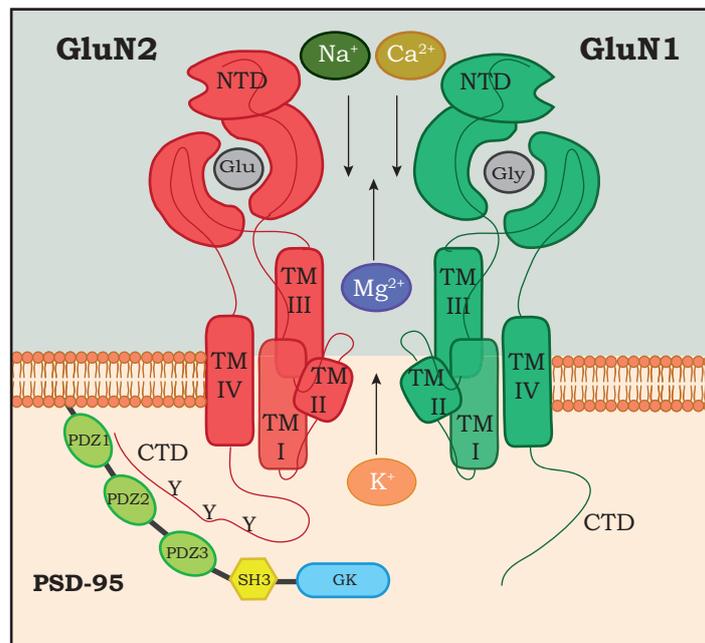


Figura I4. Estructura del NMDAR y de su proteína interaccionante PSD-95. En las secuencias extracelulares del NMDAR se distingue un dominio N-terminal (NTD) que contiene los sitios de unión de moduladores de la actividad del receptor. Los 150 aminoácidos anteriores al dominio transmembrana I (TMI) y el bucle comprendido entre TMIII y TMIV constituyen el sitio de unión al agonista, glutamato (o NMDA) a las subunidades GluN2 y de su coagonista glicina (o D-serina) a las GluN1. Los cuatro dominios transmembrana forman un canal iónico permeable a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} y sensible al bloqueo por Mg^{2+} . El dominio TMII se dispone hacia el interior del canal determinando la especificidad iónica y las propiedades electrofisiológicas del mismo. La activación del NMDAR por sus coagonistas permite la salida de K^+ y la entrada de Na^+ y fundamentalmente de Ca^{2+} . Los dominios C-terminales citoplasmáticos (CTD) son de longitud variable y contienen diversas regiones de interacción con proteínas de señalización y andamiaje de la densidad postsináptica. El dominio C-terminal de GluN1 es corto y presenta dominios de interacción con diversas proteínas. En el caso de las subunidades GluN2, esta región contiene múltiples residuos de tirosina susceptibles de ser fosforilados. Los últimos tres aminoácidos C-terminales de esta subunidad constituyen un motivo de unión a proteínas PDZ (*PSD-95/Disc large/Zona occludens-1*), implicado en la interacción con la proteína de andamiaje PSD-95. Ésta última presenta una organización en diversos dominios de interacción proteína-proteína: desde el extremo N-terminal, por el que se encuentra unida a la membrana, se suceden tres dominios PDZ, un dominio SH3 (*Src homology 3*) y un dominio GK (*guanylate kinase-like*). PSD-95 permite de forma indirecta la interacción del NMDAR con otras proteínas importantes como nNOS o Fyn o, a través de otras proteínas de andamiaje, con PKA y PP2B.

Los NMDARs poseen una combinación única de propiedades que les permiten desempeñar funciones críticas en el SNC en desarrollo y en el adulto: poseen alta afinidad por el glutamato, una cinética de activación y desactivación muy lenta y son canales altamente permeables al Ca^{2+} cuya activación es dependiente

del voltaje, encontrándose bloqueados por Mg^{2+} en condiciones basales. Además, poseen largos dominios citoplasmáticos que les permiten formar parte y organizar grandes complejos de señalización sináptica con proteínas como PSD-95 (revisado en Husi et al., 2000). Gracias a estas propiedades, los NMDARs actúan como detectores de coincidencia, permitiendo la entrada de Ca^{2+} solo cuando la despolarización de la membrana coincide con la liberación de glutamato en la sinapsis. Además, son capaces de decodificar señales de glutamato durante tiempos prolongados. Por último, cabe resaltar que la actividad del NMDAR puede ser modulada extracelularmente por H^+ , poliaminas y Zn^{2+} (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004).

5.3. Expresión temporal y regional en el SNC

Los NMDARs están ampliamente distribuidos en el SNC, aunque la expresión de las distintas subunidades depende del área cerebral y del estadio de desarrollo. La subunidad GluN1 se expresa de manera ubicua desde el estadio embrionario hasta la edad adulta, aunque existen diferencias en la expresión de isoformas específicas (Laurie and Seeburg 1994; Paupard et al., 1997). Las subunidades GluN2 muestran patrones de expresión espaciotemporal únicos (Monyer et al., 1994). Así, durante el desarrollo prenatal solo se expresan las subunidades GluN2B y GluN2D, mientras que las subunidades GluN2A y GluN2C empiezan a expresarse en la etapa postnatal. Respecto a la expresión de las subunidades GluN3, la isoforma GluN3A se expresa tempranamente en la etapa postnatal para posteriormente decaer, mientras que la expresión de GluN3B aumenta a lo largo del desarrollo (Henson et al., 2010).

Las subunidades predominantes en el cerebro adulto son GluN2A y GluN2B, particularmente en hipocampo y corteza, que se expresan junto GluN1 (Monyer et al., 1994; Watanabe et al., 1992). Existen evidencias de que GluN2A aparece mayoritariamente en las sinapsis mientras que los NMDARs conformados por subunidades GluN2B se encuentran preferencialmente en localizaciones extrasinápticas (Groc et al., 2006; Tovar and Westbrook, 1999). Se ha sugerido que la distribución sináptica de los NMDARs conformados por subunidades GluN2A viene determinada por su CTD, siendo también crítica su interacción con la proteína de andamiaje PSD-95 (Yan et al., 2014). Sin embargo, esta segregación no es estricta y las subunidades GluN2B no están restringidas a posiciones extrasinápticas ya que pueden formar también di- o triheterómeros en las sinapsis (Gray et al., 2011; Storey et al., 2011; Wyllie et al., 2013).

5.4. Mecanismos de fosforilación

La fosforilación es un mecanismo fundamental en la regulación de la función proteica que, en el caso de las subunidades del NMDARs, controla su expresión en superficie así como su permeabilidad al Ca^{2+} . Las quinasas y fosfatasas reguladoras forman complejos con los NMDARs a través de proteínas como PSD-95, permitiendo una localización estratégica próxima a su sustrato que mejora la eficiencia de las vías de señalización. Además, en neuronas, la actividad de estas enzimas está sujeta a una compleja regulación por diversas vías de señalización intracelular, produciéndose múltiples niveles de control dinámico. Por otra parte, la expresión de estas enzimas puede variar en el desarrollo o en condiciones patológicas, añadiendo una complejidad adicional a la regulación del NMDAR (revisado en Salter et al., 2009).

Existen varios sitios consenso de fosforilación para serina/treonina quinasas en el CTD del NMDAR. Así, quinasas como PKA (*protein kinase A*), PKC (*protein kinase C*), PKB (*protein kinase B*), Cdk5 (*cyclin-dependent kinase 5*), CKII (*casein kinase II*) o Dyrk1a (*Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A*) regulan

la función del NMDAR a través de cambios en el tráfico intracelular o las propiedades del canal (Lussier et al., 2015). Por otra parte, la regulación de los NMDARs mediante mecanismos de fosforilación/defosforilación en residuos de tirosina resulta clave para la regulación positiva de la función de estos receptores y se ha descrito que las SFKs (*Src Family Kinases*) juegan un papel preponderante (Ali and Salter, 2001). En el SNC se expresan ampliamente cinco SFKs: Src, Fyn (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn*), Yes (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase Yes*), Lyn (*tyrosine-protein kinase Lyn*) y Lck (*Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) que se localizan en la PSD, el principal componente estructural de las sinapsis glutamatérgicas (Huang et al., 2001; Kalia and Salter, 2003; Suzuki and Okumura-Noji, 1995). Además, las cuatro primeras SFKs forman parte del complejo del NMDAR en la PSD (Kalia and Salter 2003; Yaka et al., 2002; Yu et al., 1997). Concretamente, Src tiene un papel importante en la regulación de la actividad del NMDAR a través de la fosforilación de GluN2A y GluN2B (Salter and Kalia, 2004; Zhang et al., 2007). La actividad de esta quinasa está ampliamente regulada y, mientras que su actividad basal es baja en las sinapsis excitatorias del SNC adulto, ésta puede verse aumentada por mecanismos de señalización *upstream*. Algunas de las moléculas que regulan su actividad son enzimas activadoras de tirosina quinasas como Pyk2 (*proline-rich tyrosine kinase 2*) (Huang et al., 2001), la tirosina fosfatasa PTP α (Lei et al., 2002) y las proteínas de la PSD RACK1 (Yaka et al., 2002), H-Ras (Thornton et al., 2003) y PSD-95 (Kalia et al., 2006).

Una de las familias de fosfotirosina fosfatasas (PTPs) presentes en la PSD de las sinapsis glutamatérgicas son las STEP_s (Boulanger et al., 1995) que, al antagonizar las acciones de las SFKs, contribuyen a la regulación del NMDAR. Así, se ha descrito que la defosforilación de Fyn mediada por STEP reduce la actividad de esta quinasa afectando de esta manera a la fosforilación del NMDAR (Nguyen et al., 2002). La acción de STEP también reduce la expresión en superficie de los NMDARs (Braithwaite et al., 2006). Sin embargo, recientemente se ha descrito que PSD-95 puede ejercer en la PSD una función desestabilizante sobre la isoforma STEP₆₁, la cual actúa defosforilando el residuo Y1472 de GluN2B implicado en su endocitosis, contribuyendo por tanto a la estabilización de los NMDARs en la membrana (Won et al., 2016).

Algunas evidencias apuntan a que un desbalance en las actividades de quinasas y fosfatasas puede jugar un papel importante en enfermedades caracterizadas por una hiper- o hipofunción de los NMDARs. Así por ejemplo, la activación de la serina/treonina quinasa Cdk5 en excitotoxicidad puede contribuir a la muerte neuronal isquémica a través de la fosforilación del residuo S1232 de GluN2A, de forma que la alteración de esta interacción con GluN2A tiene un efecto neuroprotector (Wang et al., 2003). En este mismo sentido, también se ha reportado un efecto neuroprotector de un péptido que inhibe eficazmente la hiperactividad de Cdk5 en esta patología (Ji et al., 2017). Por otra parte, en isquemia también se ha observado un aumento de la fosforilación en tirosinas de GluN2A y GluN2B (Cheung et al., 2000; Takagi et al., 1999) asociado con un reclutamiento de Src y Fyn en la PSD (Takagi et al., 1999). Además, es interesante destacar el papel dual reportado para Src en la supervivencia y muerte neuronales: su inhibición provoca muerte neuronal mientras que su procesamiento por calpaína en condiciones excitotóxicas genera un fragmento neurotóxico que, como vimos, media la muerte neuronal (Iqbal Hossain et al., 2015).

5.5. Vías de señalización en supervivencia y muerte neuronal

Los NMDARs son importantes centros de transducción a partir de los cuales se generan las señales intracelulares que gobiernan la supervivencia neuronal. El tipo de señal emitida depende de la composición del NMDAR (revisado en Paoletti et al., 2013) y de las interacciones que sus subunidades establecen con proteínas de andamiaje y adaptadoras y con moléculas de señalización en distintos complejos proteicos (Husi et al., 2000). Como comentamos, existen evidencias de que la composición en subunidades del NMDAR determina en parte su localización sináptica o extrasináptica (revisado en Hoque et al., 2016). Se ha descrito incluso que estas dos subpoblaciones de NMDARs podrían diferir en sus coagonistas endógenos, siendo los receptores sinápticos activados por D-serina y los extrasinápticos por glicina (Mothet et al., 2015). En general, se admite que estos dos tipos de NMDARs ejercen acciones opuestas sobre la viabilidad neuronal tras su estimulación y, mientras que los sinápticos inician señales neuroprotectoras, los extrasinápticos provocan disfunción mitocondrial e inician cascadas de señalización neurotóxica que participan en la muerte neuronal (revisado en Hardingham et al., 2002; Parsons and Raymond, 2014). Sin embargo, existe cierta controversia respecto a este modelo y recientemente se ha descrito que dosis moderadas de NMDA activan fundamentalmente NMDARs sinápticos y promueven supervivencia, mientras que estimulaciones de mayor intensidad coactivan receptores sinápticos y extrasinápticos y provocan la muerte neuronal (Zhou et al., 2013). Este trabajo también muestra que la activación por sí solos de los NMDARs extrasinápticos, al igual que la de los sinápticos, no provoca muerte neuronal sino que induce la señalización prosupervivencia.

El aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ va a iniciar tanto la señalización neuroprotectora como la neurotóxica, siendo los determinantes estructurales contenidos en los CTDs de GluN2A y GluN2B los que gobiernan la generación de señales neuroprotectoras y neurotóxicas, respectivamente (Martel et al., 2012). La señal de Ca^{2+} a través de los NMDARs sinápticos se dirige al núcleo y allí estimula la transcripción de genes prosupervivencia (**Fig. 15**). En el núcleo, este ion activa a la CaMKK (*calcium-calmodulin-dependent kinase kinase*) y a CaMKIV, que fosforila al FT CREB implicado en la transcripción de diversos genes prosupervivencia. Así, CREB potencia la expresión de genes que protegen frente a estímulos apoptóticos y neurotóxicos (Mayr and Montminy, 2001) como los AID (*activity-regulated inhibitors of death*), que confieren a la mitocondria mayor resistencia al estrés celular (Tan et al., 2012; Zhang et al., 2009). Otros genes diana de CREB son los que codifican para las subunidades GluN1 y GluN2A del NMDAR (Desai et al., 2002; Lau et al., 2004), la neurotrofina BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) (Caccamo et al., 2010; Iwasaki et al., 2012) y su receptor TrkB (*Tropomyosin-related kinase B*) (Deogracias et al., 2004). Los niveles elevados de BDNF van a potenciar la señalización prosupervivencia de los NMDARs y reducir la neurotóxica (Lau et al., 2015), sugiriendo que la estimulación de la transcripción de *bdnf* retroalimenta la señalización neuroprotectora en las neuronas. De manera complementaria, la protección mediada por la activación del NMDAR se acompaña de un aumento en la fosforilación de TrkB, sugiriendo un incremento de la señalización por BDNF (Marini et al., 1998; Mellstrom et al., 2004). Por tanto, BDNF y glutamato, mediante la activación respectiva de los receptores TrkB y NMDARs, de expresión regulada por Ca^{2+} y CREB, proveen a las neuronas de señales prosupervivencia que están fuertemente interrelacionadas. Además de CREB, otros FTs también median la supervivencia neuronal dependiente del NMDAR como NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) (Vashishta et al., 2009) o los miembros de la familia MEF2 (Gaudilliere et al., 2002; Mao et al., 1999). Otro mecanismo

neuroprotector mediado por la estimulación de los receptores sinápticos es la supresión de genes promueve como Puma (Lau and Bading, 2009; Leveille et al., 2010), la inhibición de la expresión y/o actividad de los FT promueve FOXO (*forkhead box protein O*) (Dick and Bading, 2010) o la modulación de la transcripción de enzimas relacionadas con las defensas antioxidantes (Baxter et al., 2015; Papadia et al., 2008).

Por el contrario, GluN2B se asocia con proteínas de señalización neurotóxica que facilitan la muerte neuronal. Así, su interacción con nNOS, mediada por PSD-95, permite ligar la entrada de Ca^{2+} a través del NMDAR con la activación de la enzima, la producción de NO y el daño oxidativo (Christopherson et al., 1999). Estos complejos proteicos pueden incluir también a la chaperona HSP90 que, tras el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la activación de la calpaína, puede proteger del procesamiento a nNOS, de manera que esta sintasa no tendría actividad enzimática. La activación de nNOS ocurriría tras su disociación de estos complejos, la proteólisis por calpaína de su dominio PDZ (*PSD-95/Disc large/Zona occludens-1*) y la liberación al citosol de una forma truncada de la proteína (revisado en Averna et al., 2008; Averna et al., 2009). En condiciones de excitotoxicidad, GluN2B también interacciona con la enzima DAPK (*death-associated protein kinase*) a través de su CTD. Una vez unida, DAPK es defosforilada y activada por la fosfatasa calcineurina, siendo capaz entonces de fosforilar el residuo Y1303 de GluN2B y provocar un aumento en el flujo de Ca^{2+} a través del NMDAR (Tu et al., 2010). Además, DAPK puede activar a otras proteínas neurotóxicas como JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) y exacerbar así el daño neuronal (Wu et al., 2011).

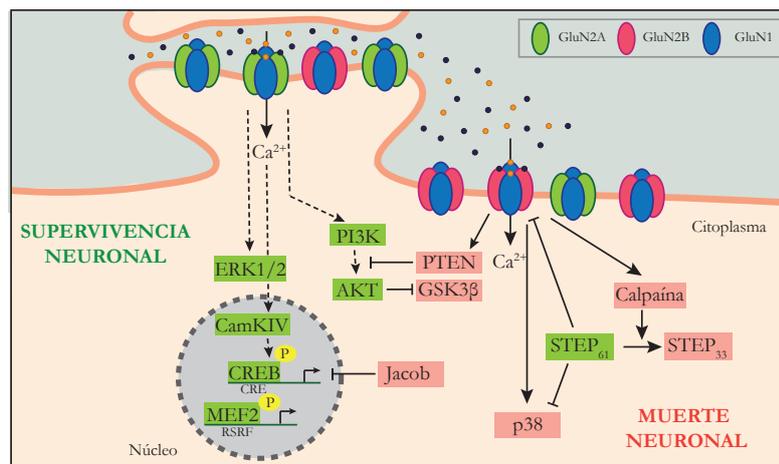


Figura 15. Vías de señalización del NMDAR. Diferentes subtipos de NMDARs están implicados en cascadas de señalización prosupervivencia o promueve neuronal. Izquierda: La activación de los NMDARs sinápticos, conformados mayoritariamente por subunidades GluN2A, provoca el aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} y la entrada de este ion en el núcleo donde promueve la transcripción de genes prosupervivencia mediada por los factores de transcripción CREB y MEF2. A través de la activación de estos receptores sinápticos también se activan las cascadas de señalización prosupervivencia mediadas por ERK1/2 y PI3K, ésta última al menos en parte por la inhibición de GSK3 β . Derecha: La activación de los NMDARs extrasinápticos, conformados mayoritariamente por subunidades GluN2B, provoca el *shut-off* de la vía de ERK1/2 así como la activación de PTEN y calpaína provocando la muerte neuronal. PTEN cataliza una reducción en PIP_3 y de la señalización de AKT. La calpaína regula positivamente la actividad de los GluN2B-NMDARs y procesa a la fosfatasa STEP₆₁ dando lugar a su isoforma inactiva STEP₃₃, incapaz de defosforilar a GluN2B o p38. Adaptado de Bartlett et al. (2013).

Otras moléculas importantes en la disyuntiva entre supervivencia o muerte neuronales son Jacob, GSK3 β , PTEN (*Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*) y STEP. La activación de los NMDARs sinápticos promueve la retención de la proteína Jacob en el citosol mediante la interacción de su señal de localización nuclear con la proteína caldendrina. Por el contrario, la activación de los NMDARs extrasinápticos permite su translocación nuclear, donde induce la defosforilación e inactivación de CREB (Dieterich et al., 2008) seguido por su degradación (Tan et al., 2012). GSK3 β es una quinasa que, en condiciones fisiológicas,

es inactivada por la vía PI3K-AKT (Grimes and Jope, 2001). Sin embargo, su activación patológica contribuye a la muerte excitotóxica a través de la estimulación de la fosfatasa PP1, que inhibe a CREB (Alberts et al., 1994). La fosfatasa dual PTEN, que actúa sobre lípidos y proteínas, puede defosforilar a PIP₃ (fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato) y así suprimir la cascada de señalización prosupervivencia puesta en marcha por PI3K-AKT. El NMDAR también es diana de PTEN (Chang et al., 2007), que se asocia a los receptores extrasinápticos regulando positivamente su apertura y contribuyendo así a la muerte neuronal excitotóxica (Ning et al., 2004). Por último, la tirosina fosfatasa STEP, concretamente la isoforma STEP₆₁, regula la actividad de ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*) y de p38, dos proteínas con funciones opuestas en supervivencia neuronal. Así, mientras que la estimulación de los NMDARs sinápticos promueve la degradación de STEP₆₁ y la activación de ERK1/2, la estimulación de los NMDARs extrasinápticos provoca su procesamiento por la calpaína II dando lugar a STEP₃₃, incapaz de defosforilar e inactivar a p38, quinasa implicada en la muerte neuronal (Deb et al., 2013; Xu et al., 2009).

El conjunto de los datos existentes permite proponer un modelo resumido en la **Fig. I6**. Así, mientras que la estimulación fisiológica del NMDAR activa complejos de supervivencia neuronal y otros involucrados en la maduración de circuitos neuronales, memoria y aprendizaje, su sobreestimulación en condiciones patológicas activa también complejos de muerte neuronal. Estos últimos ejercen una acción dominante sobre los complejos prosupervivencia y promueven la muerte. En función de este modelo, podemos entender el fallo de los antagonistas de los NMDARs usados anteriormente en terapia ya que, al bloquear también la función fisiológica de los receptores provocaban graves efectos secundarios (Gladstone et al., 2002; Wood and Hawkinson, 1997). Por ello, las estrategias de neuroprotección actualmente en desarrollo tratan de potenciar la señalización prosupervivencia del NMDAR (Hardingham et al., 2002; Liu et al., 2007; Terasaki et al., 2010) o bloquear específicamente su actividad patológica pero sin afectar a la fisiológica (Aarts et al., 2002; Ning et al., 2004; Sattler et al., 1999; Tu et al., 2010).

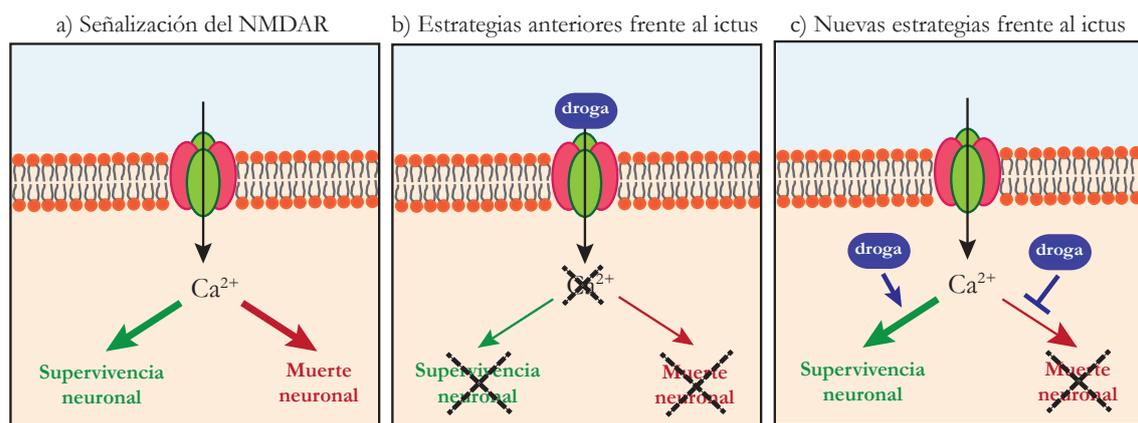


Figura I6. Terapias frente al ictus basadas en la señalización del NMDAR. a) El NMDAR puede mantener la supervivencia neuronal estimulando componentes del complejo de señalización prosupervivencia asociado a los receptores conformados por subunidades GluN2A o puede contribuir a la muerte neuronal a través de la activación del complejo de señalización promueverte asociado a los receptores conformados por subunidades GluN2B. b) Los antagonistas del NMDAR usados anteriormente se unían al receptor e inhibían tanto las vías de señalización prosupervivencia como las de muerte asociadas al mismo. c) Las nuevas estrategias en desarrollo tratan de reducir la muerte neuronal estimulando selectivamente la señalización prosupervivencia o inhibiendo la señalización promueverte asociada al receptor, sin afectar a la actividad fisiológica del mismo. Adaptado de Lai et al. (2001).

5.6. Relevancia funcional y alteraciones patológicas en el SNC

Gracias a sus propiedades únicas, los NMDARs desempeñan un papel determinante en los fenómenos de plasticidad sináptica, tales como la depresión a largo plazo (LTD) y la potenciación a largo plazo (LTP), base fisiológica de los procesos de memoria y aprendizaje (Collingridge, 1987). Dada la localización preferencial de GluN2A y GluN2B en sinapsis y posiciones extrasinápticas respectivamente, se ha sugerido un papel diferencial de las subunidades respectivamente en los procesos de LTP y LTD (Bartlett et al., 2007). La segregación en la localización de las proteínas de señalización también podría contribuir al tipo de proceso de plasticidad resultante en función de la estimulación de regiones sinápticas y extrasinápticas (revisado en Bartlett and Wang, 2013), sin embargo, este sigue siendo un tema controvertido.

Una gran variedad de enfermedades neurológicas y psiquiátricas se relacionan con defectos sinápticos y alteraciones en la función de los NMDARs, derivadas de cambios en la expresión de sus subunidades, el tráfico, la localización o la actividad del receptor. Tanto la hiperactividad como la hipoactividad del receptor resultan perjudiciales, por lo que existe un interés creciente en el desarrollo de terapias basadas en antagonistas y potenciadores del NMDAR. Sin embargo, ya que todos los subtipos de NMDARs no contribuyen de la misma manera al desarrollo de las distintas patologías, actualmente se trata de desarrollar moduladores selectivos, más efectivos y mejor tolerados que los genéricos. Así, por ejemplo, se están desarrollando moduladores alostéricos de GluN2A que provocan una desactivación más lenta del canal y con diferentes efectos durante la inducción de plasticidad sináptica (Hackos et al., 2016).

Los niveles elevados de glutamato en patologías como la isquemia, el traumatismo craneoencefálico o enfermedades neurodegenerativas como HD, PD o AD contribuyen a la pérdida de sinapsis y neuronas. El uso de antagonistas de los NMDARs tiene un efecto neuroprotector cuando se produce antes o poco después de la isquemia o de la lesión traumática (Lai et al., 2011). Sin embargo, ninguno de ellos ha sido aprobado para su uso clínico debido a la pequeña ventana terapéutica para su administración y a los graves efectos adversos que producen, sumado a la necesidad de preservar la actividad fisiológica del NMDAR para la recuperación de los pacientes (Lai et al., 2011). Una limitación importante es la falta de especificidad de los antagonistas por subunidades específicas y, por ejemplo, los selectivos de GluN2B son neuroprotectores y tienen menos efectos secundarios, aunque tampoco han conseguido buenos resultados en la clínica (Mony et al., 2009). Más recientemente, como veremos, se han desarrollado pequeños péptidos para romper la interacción de GluN2B con PSD-95 que han conseguido reducir el daño isquémico en roedores (Aarts et al., 2002; Tu et al., 2010), primates no humanos (Cook et al., 2012) y humanos (Hill et al., 2012). Otra idea atractiva en desarrollo, aspecto al que contribuirá esta Tesis, es que la activación de los receptores constituidos por subunidades GluN2A podría tener efectos positivos en supervivencia neuronal a través de activación de CREB (Chen et al., 2008a; Terasaki et al., 2010).

La sobreactivación de los NMDARs se ha observado también en AD, patología en la que actualmente se utiliza el antagonista no competitivo del NMDAR memantina para el tratamiento de casos moderados a severos. Tanto el péptido amiloide β ($A\beta$) (Snyder et al., 2005) como la proteína tau (Hoover et al., 2010) alteran la función sináptica mediante la eliminación de NMDARs sinápticos. Los efectos perjudiciales de $A\beta$ están mediados por receptores formados por subunidades GluN2B y, de hecho, los antagonistas de GluN2B pueden revertir los efectos de $A\beta$ sobre la LTP (Hu et al., 2009), la pérdida neuronal (Ronicke et

al., 2011) y la LTD (Li et al., 2009). En pacientes con PD, las disquinesias provocadas por terapias como la estimulación cerebral profunda o el reemplazo de dopamina están asociadas a la alteración de la transmisión glutamatérgica (Sgambato-Faure and Cenci, 2012). Sin embargo, antagonistas como la memantina solo han tenido efectos modestos en el alivio de estos síntomas (Sgambato-Faure and Cenci, 2012). Además, en esta enfermedad también se produce un aumento de GluN2A y una redistribución de los NMDARs compuestos por subunidades GluN2B desde posiciones sinápticas a extrasinápticas (Hallett et al., 2005). También se están utilizando antagonistas del NMDAR como la ketamina para el tratamiento de pacientes con depresión resistentes a los antidepresivos convencionales, que inducen una respuesta rápida que se correlaciona con el aumento en número y función de las conexiones sinápticas, y en la expresión de BDNF (Autry et al., 2011). En otras condiciones patológicas, como el deterioro cognitivo o la esquizofrenia, la potenciación de la función del NMDAR puede resultar beneficiosa. Por ejemplo, en esquizofrenia se produce la hipofunción de los NMDARs de neuronas GABAérgicas, provocando un desbalance entre excitación e inhibición y alteración de funciones cognitivas. La pérdida de función del NMDAR podría deberse a una pérdida preferencial de receptores con subunidades GluN2A (Woo et al., 2004) o expresión potenciada de GluN3A (Mueller and Meador-Woodruff, 2004). En estos casos, las terapias en desarrollo están dirigidas a la inhibición de los transportadores del coagonista glicina para aumentar su presencia en canal (Moghaddam and Javitt, 2012).

6. La densidad postsináptica y PSD-95

La PSD constituye un engrosamiento electrodenso debajo de la membrana postsináptica (Palay, 1956) formado por un complejo multiproteico enriquecido en receptores de neurotransmisores, moléculas de adhesión celular, enzimas de señalización, y proteínas de andamiaje, de citoesqueleto o implicadas en tráfico de membrana, así como maquinaria de síntesis y degradación de proteínas (revisado en Zhu et al., 2016). Su arquitectura es enormemente dinámica durante el desarrollo pero también en neuronas maduras (Choquet and Triller, 2013) y, en respuesta a diversos estímulos, las proteínas constituyentes pueden sufrir procesos de ensamblaje/desensamblaje, *clustering*, difusión e inserción en la membrana, todos ellos estrechamente asociados con los procesos de plasticidad sináptica (LTP y LTD) (Bosch et al., 2014; Choquet and Triller, 2013).

6.1. La proteína de andamiaje PSD-95: estructura y regulación

La principal proteína de andamiaje en la PSD de las sinapsis glutamatérgicas es PSD-95 que, por su abundancia, resulta una organizadora crucial de esta estructura (Zhu et al., 2016). Esta proteína determina el tamaño de la PSD en función del número de moléculas presentes en ella (Gray et al., 2006). Pertenece a la familia de las proteínas MAGUKs (*membrane-associated guanylate kinases*) y a la subfamilia DLG (*discs large homologue*), formada por SAP-97 (DLG1), PSD-93 (DLG2), SAP-102 (DLG3) y PSD-95 (DLG4). Todas ellas comparten una organización similar en dominios que actúan como módulos de interacción proteína-proteína (Zhang and Wang, 2003), característica que las hace idóneas para estructurar grandes complejos de señalización en las sinapsis glutamatérgicas. Desde el extremo N-terminal, se suceden tres dominios PDZ, un dominio SH3 (*Src homology 3*) y un dominio GK (*guanilate kinase-like*) (**Fig. 14**). En mamíferos, la expresión de la subfamilia DLG está altamente regulada y, concretamente, PSD-95 está ya presente en el cerebro del recién nacido y su expresión aumenta durante el desarrollo postnatal, con un patrón muy similar al de

GluN2A (Sans et al., 2000; Washbourne, 2004).

PSD-95 se dispone perpendicularmente a la membrana de la PSD, con su extremo N-terminal en contacto con ella y el C-terminal hacia el interior de la espina dendrítica (Chen et al., 2008b). Su localización sináptica está regulada de manera constante por la palmitoilación/despalmitoilación de sus residuos C3 y C5 (El-Husseini et al., 2000a; Noritake et al., 2009), procesos en los que incide la activación de los receptores de glutamato, que aumenta la despalmitoilación y liberación de PSD-95 de la membrana iniciando el recambio de proteínas sinápticas necesario para la LTP (El-Husseini A.-D. et al., 2002; Sturgill et al., 2009). Recientemente, se ha descrito que la CaM (Ca^{2+} /calmodulina), activada por la entrada de Ca^{2+} a través de los NMDARs, regula la localización sináptica de PSD-95 uniéndose a su extremo N-terminal y bloqueando su palmitoilación y anclaje a membrana (Zhang et al., 2014a). La fosforilación es otra importante modificación postraduccional que regula la estabilidad y función de PSD-95. Esta proteína posee tres sitios consenso para Cdk5 en su extremo N-terminal (T19, S25 y S35) cuya fosforilación desestabiliza la formación de multímeros y el agrupamiento de varias de sus proteínas interaccionantes de la membrana (Morabito et al., 2004). Además, la fosforilación del residuo T19 por GSK3 β también provoca la desestabilización de PSD-95 en la PSD y resulta un paso crítico para la movilización de los AMPARs y la LTD (Nelson et al., 2013). Por otra parte, su fosforilación por la quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMKII) en la S73 del dominio PDZ1 regula la transducción de la señal del NMDAR (Gardoni et al., 2006; Tsui and Malenka, 2006). Además, esta fosforilación desestabiliza a PSD-95 en la PSD provocando su salida de las espinas dendríticas activas (Steiner et al., 2008). Otras fosforilaciones importantes de PSD-95 ocurren en los residuos T287 y S290 (SAPK3 (*stress-activated protein kinase 3*)/p38 γ), modulando sus interacciones proteína-proteína en las sinapsis (Sabio et al., 2004), o S295 (JNK-1), regulando su localización sináptica y la de las proteínas interaccionantes a través de estas secuencias (Jaffe et al., 2004). Respecto a la fosforilación de tirosinas, es interesante señalar que la modificación por Src del residuo Y523 de PSD-95 tras la activación de los NMDARs media un mecanismo potenciador de la actividad de este receptor a través de la integración de la proteína Pyk2 en los complejos de PSD-95, la activación de Pyk2/Src y, finalmente, la fosforilación de GluN2A (Zhao et al., 2015).

6.2. Interacciones proteicas y función de PSD-95

Debido a su organización en diferentes dominios, PSD-95 tiene un papel central en la localización de distintos receptores, moléculas de adhesión, canales iónicos, quinasas y fosfatasa en la membrana post-sináptica (revisado en Zhu et al., 2016). Además, PSD-95 interacciona con gran variedad de moléculas adaptadoras y proteínas de citoesqueleto, motores moleculares y maquinaria de síntesis proteica (Feng and Zhang, 2009; Scannevin and Huganir, 2000). Las proteínas transmembrana interaccionan con los dominios PDZ de PSD-95 a través de los aminoácidos de su extremo C-terminal o PDZ-L (*PDZ-ligand*), siendo dichas interacciones críticas para el tráfico, *clustering*, direccionamiento o eliminación de las mismas (Chen et al., 2015). Concretamente, PSD-95 interacciona mediante sus dominios PDZ1 y PDZ2 con el PDZ-L de las subunidades GluN2 del NMDAR (Kornau et al., 1995), interacciones que resultan cruciales para el desarrollo sináptico y el agrupamiento de moléculas de señalización cerca del receptor tanto en la PSD como en *lipid rafts* (Delint-Ramirez et al., 2010). Además, se ha sugerido que PSD-95 podría tener un papel protector sobre el procesamiento de GluN2A por calpaína en excitotoxicidad (Dong et al., 2004). Por otra parte, se ha

propuesto que la interacción de PSD-95 con los AMPARs, mediada por proteínas transmembrana reguladoras de estos receptores como TARP/stargazin, modula la localización de éstos y la fuerza de las sinapsis (El-Husseini et al., 2000b; Hafner et al., 2015; Schnell et al., 2002). En conjunto, PSD-95 desempeña un papel crucial en la expresión en superficie de NMDARs y AMPARs, en su endocitosis y su localización celular. Gracias a ello, PSD-95 puede regular la composición en subunidades de los receptores y la conductancia del canal de los receptores sinápticos, en particular, de los NMDARs (Kalia et al., 2006; Kim and Sheng, 2004).

Entre las interacciones mediadas por los dominios PDZ de PSD-95, resulta particularmente interesante la establecida con la subunidad GluN2B y la enzima nNOS que, como vimos, permite ligar la entrada de Ca^{2+} a través del NMDAR a la activación de nNOS y la producción de NO (Christopherson et al., 1999). Esta asociación juega un papel importante en funciones neuronales como la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria (Jaffrey and Snyder, 1995) pero también en la fisiopatología de enfermedades como la isquemia (Aarts et al., 2002; Sun et al. 2008; Zhou et al., 2010) o la HD, donde contribuye a la muerte neuronal. Sin embargo, la función biológica de nNOS no es siempre deletérea, ya que su translocación al núcleo y posterior interacción con el FT Sox2 puede tener una función neuroprotectora en fases tempranas de la excitotoxicidad (Zhang et al., 2016). Por último, PSD-95 también interacciona a través de sus dominios PDZ con SFKs implicadas en la regulación de la actividad del NMDAR. Así por ejemplo, la formación de un complejo PSD-95-Fyn-NMDAR facilita la fosforilación por parte de esta quinasa de las subunidades GluN2 del NMDAR (Tezuka et al., 1999).

Por su parte, el dominio SH3 de PSD-95 forma una unidad estructural con el dominio GK que confiere sitios adicionales de unión a proteínas (Shin et al., 2000). A través de ellos interacciona, por ejemplo, con AKAP79/150 (*A-kinase-anchoring protein 79/150*). Ésta es una proteína de anclaje que interacciona con quinasas y fosfatasa como PKA y PP1 y que se relaciona con la endocitosis de los AMPARs y el proceso de LTD (Bhattacharyya et al., 2009).

6.3. Implicación de PSD-95 en patologías del SNC

Dado el papel tan importante que PSD-95 desempeña como estabilizador y localizador de los NMDARs en la PSD, las alteraciones que afectan a su función van a provocar déficits en la transmisión sináptica (revisado en Iasevoli et al., 2013). Se ha descrito que PSD-95 está implicada en la fisiopatología de alteraciones del SNC como AD, el síndrome del cromosoma X frágil (FXS), HD, esquizofrenia, displasia cortical, procesos de adicción e isquemia cerebral. En AD, los niveles de PSD-95 y otras proteínas de la PSD como SynGAP están reducidos en la corteza frontal (Gong et al., 2009), sugiriendo una destrucción de la PSD que afecta a la transmisión sináptica. El péptido $A\beta$ sería el inductor de la degradación de PSD-95 que estaría mediada por la actividad del NMDAR (Roselli et al., 2005). Por otra parte, el FXS se caracteriza por una alteración en la traducción de la proteína FMRP (*fragile X mental retardation protein*), que en condiciones fisiológicas regula la traducción de mensajeros codificantes para varias proteínas, entre ellas PSD-95 (Bassell and Warren 2008; Muddashetty et al., 2007). El resultado es la alteración de los procesos de LTP y LTD (Luscher and Huber, 2010) y del número, forma y tamaño de las espinas dendríticas (Pfeiffer and Huber, 2009). En HD, la función de la huntingtina normal como proteína interaccionante de PSD-95 se pierde para su forma mutante, facilitándose la formación del complejo GluN2B-PSD-95-nNOS y la señalización excitotóxica

mediada por nNOS, que contribuye a la pérdida neuronal (Sun et al., 2001). En esquizofrenia se producen variaciones en los niveles de PSD-95 en función de la región cerebral observándose, por ejemplo, aumentos en el tálamo (Ohnuma et al., 2000) y disminuciones en la corteza prefrontal (Dracheva et al., 2001). También se han observado variantes alélicas en su gen codificante que se asocian con una mayor susceptibilidad a padecer esquizofrenia (Cheng et al., 2010). En pacientes de displasia cortical, se ha observado un incremento en la asociación de PSD-95 con las subunidades GluN1 y GluN2B del NMDAR que podría contribuir a la hiperexcitabilidad y generación de crisis epilépticas propias de esta patología (Ying et al., 2004). También resulta muy interesante la regulación epigenética positiva de PSD-95 observada en procesos de adicción, que es dependiente de CREB y contribuye a la potenciación de la transmisión glutamatérgica y al mecanismo de recompensa inducido por la morfina (Wang et al., 2014).

En cuanto a la isquemia cerebral, diversas evidencias han implicado a PSD-95 en las alteraciones patológicas resultantes. Por una parte, la supresión de su expresión provoca una disminución de la muerte neuronal tras la isquemia (Hou et al., 2005) y la disociación del complejo NMDAR-PSD-95-nNOS (Aarts et al., 2002) es actualmente una estrategia neuroprotectora muy prometedora en esta patología. Sin embargo, existen datos contradictorios ya que la carencia de PSD-95 aumenta la susceptibilidad de las neuronas a la excitotoxicidad, ocasionando daño neuronal y trastornos neurológicos (Zhang et al., 2014b). El trabajo anterior de nuestro laboratorio demostró que la excitotoxicidad y la consecuente activación de la calpaína provocan el procesamiento de PSD-95 en isquemia (Gascon et al., 2008b). Sin embargo, hasta el momento desconocíamos como dicho procesamiento podría alterar la función de esta proteína o si contribuía a la neurodegeneración. Por ello, la exploración de estrategias dirigidas al bloqueo del procesamiento de PSD-95 en isquemia tiene gran interés para establecer su importancia como mecanismo patológico y, en su caso, el desarrollo de nuevas herramientas de neuroprotección.

7. Transducción peptídica y neuroprotección

El desarrollo de estrategias neuroprotectoras para el tratamiento eficaz del ictus y otras enfermedades del SNC se encuentra muy limitado por la función protectora de la barrera hematoencefálica (BHE), que dificulta enormemente la entrada eficiente de moléculas terapéuticas al cerebro (revisado en Sharma et al., 2016). Entre las estrategias en desarrollo para sortear este problema, resulta muy novedosa y prometedora la utilización como *carrier* de ciertos péptidos con propiedades de permeabilidad celular (CPPs, *cell-penetrating peptides*) y capaces de cruzar la BHE. Los CPPs son pequeños (menos de 30 aminoácidos) y frecuentemente tienen carga positiva. Poseen la capacidad de transportar moléculas cargo (tales como péptidos, proteínas u oligonucleótidos) dentro de las células, mediante translocación directa o endocitosis, sin efectos citolíticos (Milletti, 2012). Estas características hacen de estas moléculas candidatos interesantes para el tratamiento de enfermedades del SN, sin embargo, sus inconvenientes principales son su estabilidad reducida y falta de especificidad. En el caso de la isquemia, la falta de especificidad se ve compensada por la inducción de los procesos de endocitosis en condiciones excitotóxicas (Vaslin et al., 2009), un atractivo para su uso en patologías en las que participa este mecanismo de muerte neuronal. Entre los CPPs más ampliamente utilizados se encuentra una secuencia de once aminoácidos (YGRKKRRQRRR) de la proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) responsable de sus propiedades de transducción proteica (Schwarze et al.,

1999). Utilizando esta estrategia, en los últimos años se han desarrollado péptidos neuroprotectores capaces de romper interacciones proteicas (Aarts et al., 2002; Ji et al., 2017; Tu et al., 2010; Tu et al., 2015), evitar el procesamiento por calpaína de determinados sustratos (Du et al., 2010; Gamir-Morralla et al., 2015) o bloquear procesos de ubiquitinación (Zhang et al., 2013b) o fosforilación (Liu et al., 2015). Un ejemplo destacado es el péptido Tat-NR2B9c (NA-1), que posee la secuencia Tat fusionada a los nueve aminoácidos del CTD de GluN2B y rompe su interacción con PSD-95, impidiendo así la formación del complejo GluN2B-PSD-95-nNOS, la activación de nNOS y la formación de NO en condiciones excitotóxicas (Aarts et al., 2002). Este péptido reduce el volumen del infarto cerebral en diversos modelos murinos de isquemia cerebral (revisado en Montaner et al., 2013) y en primates no humanos (Cook et al., 2012). Además, un estudio clínico de fase 2 ha demostrado que Tat-NR2B9c disminuye el número de lesiones en pacientes con infartos iatrogénicos inducidos tras cirugía endovascular dirigida a la reparación de aneurismas intracraneales (Hill et al., 2012). En la actualidad, un ensayo clínico en fase 3 está evaluando si la administración temprana de este péptido puede reducir el grado de discapacidad asociado a la isquemia aguda. En conjunto, los resultados obtenidos muestran que la neuroprotección es posible en humanos y sugieren que las estrategias preventivas de la señalización excitotóxica son factibles en la práctica clínica.

Dada la importancia del mantenimiento de la función fisiológica del NMDAR en el SNC y el papel crucial de su proteína interaccionante PSD-95 en la regulación de la localización y actividad del receptor, en esta Tesis hemos investigado nuevas estrategias de neuroprotección basadas en la transducción peptídica para interferir específicamente el procesamiento por calpaína de GluN2A y PSD-95 inducido en condiciones de excitotoxicidad. Las herramientas desarrolladas tendrían un enorme potencial terapéutico al contribuir al mantenimiento de la supervivencia y actividad neuronales en condiciones patológicas.

OBJETIVOS

El principal propósito de este trabajo es el desarrollo de nuevas herramientas de neuroprotección en excitotoxicidad e isquemia cerebral, diseñadas en base a las alteraciones que sufren los receptores de glutamato de tipo NMDA y la proteína de andamiaje PSD-95 en dichos procesos y que, previsiblemente, afectan de manera negativa a la supervivencia neuronal. Con esta finalidad, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1.** Profundizar en el procesamiento de la subunidad GluN2A del NMDAR así como de su proteína interaccionante PSD-95 inducidos por la activación de la calpaína en excitotoxicidad, analizando posibles mecanismos reguladores de dicho procesamiento.
- 2.** Desarrollar péptidos neuroprotectores capaces de prevenir el procesamiento de GluN2A inducido en condiciones de excitotoxicidad.
- 3.** Desarrollar péptidos neuroprotectores capaces de evitar el procesamiento de PSD-95 en situaciones excitotóxicas.
- 4.** Analizar el efecto de estas nuevas herramientas como posible tratamiento frente al ictus, evaluando su eficacia en un modelo murino de isquemia cerebral permanente.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

Los reactivos utilizados en este trabajo se muestran en la **Tabla M1**.

Reactivo	Función	Concentración de uso	Tiempo de tratamiento	Casa comercial
NMDA	Agonista NMDAR	5, 20, 50 ó 100 μ M	2-8 h	Tocris Bioscience
Glicina	Coagonista NMDAR	10 μ M	2-8 h	Sigma-Aldrich
DL-AP5	Antagonista NMDAR	200 μ M	24 h	Tocris Bioscience
Glutamato (Glu)	Agonista NMDAR	100 μ M	6 h	Ascent Scientific
Ifenprodil	Antagonista NMDAR	10 μ M	0.5 h pre-tto.	Tocris Bioscience
Memantina	Antagonista NMDAR	10 μ M	0.5 h pre-tto.	Ascent Scientific
Ketamina	Antagonista NMDAR	500 μ M	0.5 h pre-tto.	Sigma-Aldrich
CiIII	Inhibidor calpaína	10 μ M	0.5 h pre-tto.	Calbiochem
Calpeptina	Inhibidor calpaína	10 μ M	0.5 h pre-tto.	Calbiochem
Wortmanina	Inhibidor PI3K	100 nM	0.5 h pre-tto.	Ascent Scientific
UO126	MEK1/2	10 μ M	0.5 h pre-tto.	Cell Signaling
KG-501	Inhibidor CREB	10 μ M	0.5 h pre-tto.	Sigma-Aldrich
STO-609	Inhibidor CaMKK	10 μ M	0.5 h pre-tto.	SCBT
Ácido okadaico (AO)	Inhibidor Ser/Thr fosfatasas PP1 y PP2A	1 μ M	15 min – 4 h	Tocris Bioscience
Ortovanadato	Inhibidor Tyr fosfatasas	50 μ M	15 min - 4 h	Sigma-Aldrich
Genisteína	Inhibidor Tyr quinasas	10 μ M	30 min – 4 h	Ascent Scientific
Yoduro de propidio (PI)	Agente intercalante fluorescente	50 μ M	5 min	Sigma-Aldrich
Calpaína I	Enzima	25-100 U/ml	15 min-2 h	Calbiochem
Fluoro-Jade C (FJC)	Marcador de neuronas en degeneración	0.00002%	10 min	Merck Millipore

Tabla M1. Compuestos químicos y enzimas utilizados en este trabajo. NMDA, N-metil-D-aspartato; DL-AP5, ácido 2-amino fosfotanoico; CiIII, *calpain inhibitor III*; pre-tto., pretratamiento; SCBT, Santa Cruz Biotechnology.

2. Tampones y soluciones

- Phosphate Buffer (PB) 0.1 N: KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 8 mM (pH 7.4).
- Phosphate Buffered Saline (PBS) 0.1 M: NaCl 136 mM, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 8 mM (pH 7.4).
- Hepes Buffer: Hepes (pH 7.4).
- Tris Buffered Saline (TBS): Tris-Cl 20 mM (pH 7.5), NaCl 137 mM.
- TBS-Tween (TBS-T): TBS, Tween-20 0.5%.
- Solución de bloqueo: leche de vaca desnatada en polvo 5% preparada en TBS-T.
- Tampón de electroforesis: Tris-HCl 25 mM (pH 8.3), glicina 250 mM, dodecil sulfato sódico (SDS) 0.1%.
- Tampón de electroforesis MOPS para gels Bis-Tris: MOPS 50 mM, Tris 50 mM, ácido etilendiamino-tetracético (EDTA) 1 mM, SDS 0.1%, NaHSO₃ 5 mM.

- Tampón de carga de electroforesis: Tris-HCl 50 mM (pH 6.8), ditiotretitol (DTT) 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0.005%, glicerol 10%.
- Tampón de transferencia: Tris-HCl 25 mM, glicina 250 mM (pH 8.3), metanol 10%.
- Tampón de transferencia para geles Bis-Tris: Tris-HCl 25 mM, glicina 250 mM (pH 8.3), metanol 20%.
- Tampón de lisis RIPA: Na₂HPO₄ 10 mM (pH 7.2), NaCl 150 mM, deoxicolato sódico 1%, NP-40 1%, SDS 0.1%.
- Tampón de lisis para muestras de hipoglucemia: Hepes 25 mM (pH 7.4), EDTA 1.3 mM, ácido etilen-bis (oxietrileno nitrilo) tetracético (EGTA) 1 mM, MgCl₂ 5 mM, Tritón X-100 0.1%.
- Tampón de lisis para inmunoprecipitación (IP): NP-40 1%, NaCl 80 mM, EDTA 20 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8).
- Tampón de lisis para ensayos de actividad promotora (luciferasa): *passive lysis buffer* de Promega.
- Reactivo para ensayo de actividad promotora: 25 mM glicilglicina, 15 mM SO₄Mg, 4 mM EGTA, 15 mM fosfato potásico, 3.3 mM ATP, 1 mM DTT, 75 μM luciferina.

3. Péptidos sintéticos

Los péptidos sintéticos utilizados en este trabajo en los ensayos *in vitro* e *in vivo* se obtuvieron de Immunostep, GenScript y China Peptides y se muestran en la **Tabla M2**.

Péptido	Origen	Posición aa.	Secuencia
TMyc	c-Myc	408-421	YGRKKRRQRRRAEEQKLISEEDLLR
MTMyc	c-Myc	408-421	Ac-YGRKKRRQRRRAEEQKLISEEDLLR-NH ₂
TP95 ₂₉	PSD-95	29-42	YGRKKRRQRRRLPNQANSPPVIVNT
TP95 ₂₅₉	PSD-95	259-284	YGRKKRRQRRRDITTSYSQHLDNEISHSSYLGTDYPT
TP95 ₄₁₄	PSD-95	414-427	YGRKKRRQRRRSSLGSGTASLRSNP
MTP95 ₄₁₄	PSD-95	414-427	Ac-YGRKKRRQRRRSSLGSGTASLRSNP-NH ₂
TG2A ₉₃₆	GluN2A	936-949	YGRKKRRQRRRSDKGNLIYSDNRSF
FITC-TG2A ₉₃₆	GluN2A	936-949	FITC-YGRKKRRQRRRSDKGNLIYSDNRSF
TG2A ₁₁₇₉	GluN2A	1179-1192	YGRKKRRQRRRPNNDQKLYAKHFT
MTG2A ₁₁₇₉	GluN2A	1179-1192	Ac-YGRKKRRQRRRPNNDQKLYAKHFT-NH ₂
TG2A _{936(Y943F)}	GluN2A	936-949 (Y943F)	YGRKKRRQRRRSDKGNLIFSDNRSF
TG2A _{1179(Y1184F)}	GluN2A	1179-1192 (Y1184F)	YGRKKRRQRRRPNNDQFKLYAKHFT
TG2A _{1179(Y1187F)}	GluN2A	1179-1192 (Y1187F)	YGRKKRRQRRRPNNDQKLFKAKHFT
TG2A _{1179(Y1184-7F)}	GluN2A	1179-1192 (Y1184-7F)	YGRKKRRQRRRPNNDQFKLFAKHFT

Tabla M2. Péptidos Tat utilizados en este trabajo. Los péptidos diseñados contienen la región de la proteína Tat responsable de sus propiedades de permeabilidad (en cursiva) unida a las posiciones aminoácidas mostradas, correspondientes a las proteínas de rata indicadas (en negrita). El péptido fluorescente FITC-TG2A₉₃₆ porta el fluoróforo FITC (*fluorescein isothiocyanate*) unido a su extremo N-terminal. Los péptidos MTMyc, MTP95₄₁₄ y MTG2A₁₁₇₉ se encuentran acetilados (Ac) y amidados (NH₂) en sus extremos N- y C-terminal, respectivamente.

4. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados y los detalles de los mismos se reflejan en la **Tabla M3**.

Anticuerpo	Inmunógeno	Hospedador	Dilución			Casa Comercial
			WB	ICQ/ IHQ	IP	
AKT	aa. 345-480 AKT1 humano	Conejo (P)	1:1000			SCBT (8312)
pAKT	Fosfopépt. sint. aa. S473 y próx. de ratón	Conejo (P)	1:500			Cell Signaling Tech. (9271)
BDNF	Prot. recomb. de BDNF humano	Conejo (P)	1:200			Ch. International (AB1779SP)
CREB	Región Nt CREB humano	Conejo (P)	1:1000			Cell Signaling Tech. (9197)
pCREB	Fosfopépt. sint. del aa. S133 de CREB	Conejo (P)	1:1000			Merck Millipore (06-519)
pERK5	Fosfopépt. sint. T218/Y220 y próx. de ERK humana	Conejo (P)	1:1000			Cell Signaling Tech. (3371)
Espectrina	Membranas eritrocitos pollo	Ratón (M)	1:20000			Chemicon (MAB1622)
GluN1	aa. 660-811 de GluN1 de rata	Ratón (M)	1:1000			BD Pharmingen (556308)
GluN2A	Región Ct GluN2A humana	Cabra (P)	1:250	ICQ: 1:50 IHQ: 1:25		SCBT (sc-1468)
HA.11	YPYDVPDYA	Ratón (M)	1:1000			Covance (MMS-101P)
NSE	Pépt. sint. NSE humana	Conejo (P)	1:20000			Chemicon (AB951)
PSD-95 aa. 77-299	aa. 77-299 de PSD-95 humana	Ratón (M)		ICQ: 1:1000 IHQ: 1:500		Antibodies Inc. (75-028)
PSD-95 Ct	aa. 353-504 de PSD-95 humana	Ratón (M)	1:250			BD Trans. Labs. (610496)
PSD-95 Nt	Pépt. sint. conjugado con KLH aa. 50-150 de PSD-95 de ratón	Conejo (P)	1:1000			Abcam (ab18258)
Sinapsina	Sinapsina I de cerebro bovino	Conejo (P)		1:1000		Millipore (AB1543)
TrkB	aa. 160-340 TrkB humano común a todas las isoformas	Conejo (P)	1:500			SCBT (sc8316)
pTrkB	Fosfopépt. sint. aa. Y940 de TrkA humano (reconoce TrkB/C)	Conejo (P)	1:500			Cell Signaling Tech. (9141)
βIII-tubulina	aa. 443-450 β III-tubulina humana	Ratón (M)		1:2000		Ch. International (MAB1637)
pY	Phosphotyramine –KLH	Ratón (M)			4 μ g/1 mg prot.	Merck Millipore (05-321)

Anticuerpo	Inmunógeno	Hospedador	Dilución			Casa Comercial
			WB	ICQ/ IHQ	IP	
Anti-cabra HRP	IgG de cabra	Burro (P)	1:5000			SCBT (sc-2056)
Anti-conejo HRP	IgG de conejo	Cabra (P)	1:5000			SCBT (sc-2004)
Anti-ratón HRP	IgG de ratón	Cabra (P)	1:5000			SCBT (sc-2005)
Anti-cabra Alexa 488	IgG de cabra	Burro (P)		1:500		Mol. Probes (A-11045)
Anti-ratón Alexa 488	IgG de ratón	Cabra (P)		1:500		Mol. Probes (A-11001)
Anti-cabra Alexa 546	IgG de cabra	Burro (P)		1:500		Mol. Probes (A-11056)
Anti-conejo Alexa 546	IgG de conejo	Cabra (P)		1:500		Mol. Probes (A-11035)
Anti-conejo Alexa 546	IgG de conejo	Cabra (P)		1:500		Mol. Probes (A-10040)
Anti-ratón Alexa 546	IgG de ratón	Cabra (P)		1:500		Mol. Probes (A-11030)
Anti-ratón Alexa 546	IgG de ratón	Burro (P)		1:500		Mol. Probes (A-10036)

Tabla M3. Anticuerpos utilizados en este trabajo. Se indican las proteínas reconocidas, el inmunógeno empleado y la especie hospedadora en la que se desarrolló cada uno de los anticuerpos, así como la dilución de uso en los experimentos. WB, *Western blot*; ICQ, Inmunocitoquímica; IHQ, Inmunohistoquímica; IP, Inmunoprecipitación; Ct, C-terminal; Nt, N-terminal; (P), policlonal; (M), monoclonal; SCBT, Santa Cruz Biotechnology; Antibodies Inc., Antibodies Incorporated; BD Trans. Labs., BD Transduction Laboratories; Mol. Probes, Molecular Probes; pépt., péptido; fosfo-pépt., fosfopéptido; sint., sintético; Prot. Recomb., proteína recombinante.

5. Plásmidos y vectores lentivirales

- **pCRE:** cedido por la Dra. Rodríguez-Peña (Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Madrid, España). Fue obtenido a partir del vector pTK-luc (Promega, *Madison, USA*) en el que se insertó delante del gen de la luciferasa un oligonucleótido (35 bases) que contiene los dos elementos CRE (*cAMP response element*) del promotor de TrkB (Deogracias et al., 2004).
- **pMEF (pRSRF):** plásmido cedido por el laboratorio del Dr. Winoto (*Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley, USA*). Contiene el gen de la luciferasa insertado en pGL2-*basic* (Promega, *Madison, USA*) bajo el control de un fragmento de la región promotora del gen *Nur77* (-307/-242) que incluye dos sitios RSRF (MEF2) de secuencia conocida (CTATATTTAG y CTATTTATAG) (Woronicz et al., 1995).
- **pTrkB (pAcc o -1600trkB-P2-luc):** contiene el fragmento -1606 a -325 de la región promotora del gen *Ntrk2* codificante para TrkB, subclonado en el vector pGL3-*basic* (Promega, *Madison, USA*) controlando la expresión de la luciferasa (Deogracias et al., 2004). Este fragmento contiene unos de los dos promotores de TrkB (P2) (Barettino et al., 1999) y los dos elementos CRE presentes entre P1 y P2.
- **pBDNF (pIII BDNF):** plásmido generado en el laboratorio del Dr. Greenberg (*Children’s Hospital, Department of Neurobiology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA*). Contiene un fragmento de

170 pb del promotor III del gen *bdnf* de rata clonado en el vector pGL3-*basic* (Promega, Madison, USA) regulando la expresión de la luciferasa (Tao et al., 1998). Posee un *CRE-like element* (TCACGTCA) 35 bp 5' del primer sitio de iniciación del exón III.

- **pGluN1 (pNRL 5.4 Kb):** plásmido cedido por el Dr. Bai (*University of Maryland, USA*) que contiene una región promotora de 5.4 Kb del gen *Grin1* de rata codificante para la subunidad GluN1 del NMDAR. Dicha región está insertada en el plásmido pGL3-*basic* (Promega, Madison, USA) controlando la expresión del gen de la luciferasa de luciérnaga (Bai et al., 2003). Cabe destacar la presencia de 3 elementos CRE en posiciones -315/-293, -343/-324 y -502/-482 (Lau et al., 2004) y un elemento MEF2 en la posición -809/-795 (Krainc et al., 1998).
- **pGluN2A:** plásmido cedido por el Dr. Buonano (*Section of Molecular Neurobiology, NICHD, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA*), que contiene un fragmento de la región promotora del gen *Grin2a* (-1253/-210) de ratón, codificante para la subunidad GluN2A del NMDAR. Este fragmento está insertado en el plásmido pGL3-*basic* (Promega, Madison, USA) controlando la expresión del gen de la luciferasa (Desai et al., 2002). Posee un *CRE-like element* (TGACATCA) en la posición -1195.
- **LV-GluN2A:** vector lentiviral Syn-HA-GluN2A diseñado previamente en nuestro laboratorio (Gascon et al., 2008a) que expresa la proteína GluN2A de rata con la secuencia HA en su región N-terminal, entre los aa. 56 y 57. Como elementos de control de la expresión, este vector contiene un promotor neuroespecífico del gen humano de la sinapsina I y una secuencia estabilizadora WPRE tras el ADNc, capaz de estimular la expresión de genes heterólogos. Esta construcción fue utilizada como vector de partida para obtener por mutagénesis dirigida los plásmidos LV-GluN2A-M2 y LV-GluN2A-M3.
- **LV-GluN2A-M2, LV-GluN2A-M3:** vectores lentivirales generados a partir del anterior en el que se mutagenizaron respectivamente 3 ó 4 aminoácidos considerados como posibles secuencias de reconocimiento por calpaína en la proteína GluN2A. Estos vectores expresan de manera neuroespecífica proteínas GluN2A con sustituciones alifáticas respectivamente en sus aa. 942-944 (TYS/AAA) y 1184-1187 (YKLY/VAAA) (González-Camacho, 2012).
- **LV-GluN2A-M2/3:** este vector que dirige la expresión de una GluN2A doblemente mutada se generó utilizando el ADN de LV-GluN2A-M3 como molde y añadiendo una segunda sustitución en los aa. 942-944.

6. Cultivos celulares

6.1. Cultivos primarios de neuronas corticales de rata

Los cultivos primarios de neuronas corticales se obtuvieron a partir de embriones de rata Wistar de día E-18 según el protocolo descrito previamente (Rose et al., 1993) con algunas modificaciones. Los animales se obtuvieron en el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” y los procedimientos utilizados para su manipulación y sacrificio siguieron las directrices de la Directiva 2010/63/EU y el Real Decreto 53/2013 y documentos complementarios a la ley, y contaron con la aprobación del Comité Ético del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Las placas fueron pretratadas con poli-L-lisina (100 µg/ml, Sigma-Aldrich) y laminina (4 µg/ml, Sigma-Aldrich) durante una noche a 37°C antes de su lavado y secado. Las cortezas cerebrales fueron diseccionadas y homogeneizadas mecánicamente en medio

de cultivo *Minimum Essential Medium* (MEM, ref. 21090-022, Life Technologies) suplementado con glucosa 22.2 mM, glutamax 0.1 mM (Life Technologies), suero fetal bovino (FBS, Life Technologies) 5%, suero de caballo (HS, Life Technologies) 5%, penicilina (100 U/ml, Life Technologies) y estreptomycin (100 µg/ml, Life Technologies). Las células se sembraron a alta densidad (1 millón de células/ml) en el mismo medio y se mantuvieron en una atmósfera a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Para inhibir el crecimiento de las células gliales se añadió al medio de cultivo el agente intercalante del ADN citosina-β-D-arabino-furanósido (AraC, 10 µM, Sigma-Aldrich) a 7 días *in vitro* (DIVs). A continuación, los cultivos se mantuvieron hasta completar un total de 13-14 DIVs, momento en que presentaban un alto grado de maduración y diferenciación, con dendritas y axones que formaban una densa red que recubría toda la placa de cultivo. En este momento, las células se trataron con los reactivos indicados en cada caso.

6.2. Cultivo de células HEK293T

La línea celular de riñón embrionario humano HEK293T fue cultivada en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, ref. 41966-052, Life Technologies) suplementado con 10% FBS, penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) y mantenida a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

7. Modelo animal de isquemia cerebral

Ratones macho Balb/c (25-30 g, Harlan Laboratories) de 8-12 semanas de edad fueron estabulados bajo condiciones controladas de comida y luz (ciclo 12 h) con acceso *ad libitum* a comida y agua y sometidos a isquemia cerebral permanente realizada mediante fototrombosis según el método descrito previamente (Schroeter et al., 2002) con algunas variaciones. Este procedimiento, que cumple con la ley de la Comunidad Europea 2010/63/EU y el Real Decreto 53/2013 y documentos complementarios a la ley, y cuenta con la aprobación de los comités éticos del CSIC y de la Comunidad de Madrid (Ref PROEX 221/14), consiste en la inducción fotoquímica de una trombosis y coagulación microvascular masiva en un área cerebral determinada por administración de un compuesto altamente fotosensible, como es el Rosa de Bengala, que induce daño endotelial y agregación plaquetaria tras su irradiación. Para ello, los animales fueron anestesiados con mascarilla facial con isoflurano 1% en oxígeno, colocados en un marco estereotáxico (Narishige), y su temperatura corporal mantenida a 37°C durante todo el procedimiento mediante una manta térmica. Tras una incisión medial del tejido pericraneal, el cráneo fue expuesto y los puntos anatómicos Bregma y Lambda identificados. El haz de fibra óptica de una fuente de luz fría (KL 1500 LCD, Schott), con una apertura de 1.5 mm de diámetro, se colocó directamente sobre el cráneo en el hemisferio derecho a 0.2 mm anterior y 2 mm lateral respecto de Bregma (+0.2 AP, +2 ML), centrándose sobre una marca realizada previamente utilizando un micromanipulador. El compuesto Rosa de Bengala (20 mg/kg, Sigma-Aldrich) disuelto en solución salina fue inyectado por vía intravenosa (i.v.) utilizando el seno venoso por inyección retro-orbital. Cinco minutos después se inició la irradiación (600 lms, 3000 K), que se prolongó por 10 min adicionales. Las condiciones utilizadas en los experimentos iniciales fueron ligeramente diferentes: coordenadas -2 AP, +3 ML o 0 AP, +3 ML, según se indica, irradiación durante 15 min y diámetro del haz de 2.25 mm. En cualquier caso, una vez inducida la lesión se suturó la incisión realizada y se permitió la recuperación de los animales. Adicionalmente, ratones *sham-operated*, utilizados como control, fueron tratados de igual manera

aunque omitiendo la irradiación con la luz fría. En los experimentos de *Western blot* (WB) e inmunohistoquímica (IHQ), en animales sacrificados a distintos tiempos, el área de tejido isquémico del hemisferio ipsilateral fue comparado con su región correspondiente del hemisferio contralateral, utilizada como control.

Cuando así se indica, los animales fueron divididos aleatoriamente en grupos experimentales a los que se administraron los diferentes péptidos Tat disueltos en solución salina por vía i.v. (retro-orbital). Las concentraciones utilizadas fueron de 3 nmol/g en experimentos preliminares o 10 nmol/g posteriormente, siendo los péptidos administrados respectivamente 5 min antes del inicio del daño o 10 minutos después en modo “ciego” para la experimentadora. Algunos animales fueron evaluados 24 h después del inicio del daño mediante RMN o ensayos de coordinación motora, siendo sacrificados seguidamente para la evaluación del volumen del infarto mediante tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC, Sigma-Aldrich) mediante dislocación cervical bajo anestesia gaseosa por vía inhalatoria con isofluorano. En todos los experimentos se trató de optimizar el número de animales usados así como de minimizar su sufrimiento.

8. Modelo animal de hipoglucemia

Ratas macho adultas (280-320 g) del animalario del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) fueron utilizadas para este procedimiento, que se realizó de acuerdo con la guía del *National Institute of Health* (NIH) para el cuidado y uso de animales de laboratorio, con la aprobación del Comité de Cuidado Animal (CICUAL) del Instituto de Fisiología Celular (UNAM). Se realizaron todos los esfuerzos para optimizar el número de animales usados y minimizar su sufrimiento. Los animales fueron alojados bajo condiciones controladas de temperatura y luz (ciclo de 12 h) con acceso *ad libitum* a comida y agua. Una semana antes de la inducción de hipoglucemia, se les implantaron electrodos epidurales bajo anestesia con isofluorano 1.5-2% para realizar los registros electroencefalográficos (**Fig. M1**). Para inducir la hipoglucemia, se mantuvo a las ratas en ayunas durante la noche antes de recibir una inyección intraperitoneal de 30 U de insulina bovina (Sigma-Aldrich) como se describió anteriormente (Haces et al., 2008). Se extrajo sangre de las colas con objeto de monitorizar la concentración de glucosa en sangre con un glucómetro (Abbott Laboratories) a diferentes intervalos después de la administración de insulina y antes de la infusión de glucosa.

Tras la inyección de insulina, el electroencefalograma (EEG) de los animales hipoglucémicos exhibió todas las etapas características de la hipoglucemia, como se describió anteriormente (Auer et al., 1984a; Suh et al., 2003). Entre las 2 y 3 h después de la inyección, la actividad eléctrica del cerebro se vio afectada, revelando un aumento en la amplitud y un enlentecimiento de las ondas theta (4-8 Hz) y delta (1-4 Hz). En esta etapa los animales estaban somnolientos y perdieron el reflejo de enderezamiento (RR, *righting reflex*, estado en el que los animales pierden la habilidad para recuperar su posición horizontal al darlos la vuelta) (Gundersen et al., 2001), un comportamiento que precede al inicio de la isoelectricidad (sin actividad EEG o EEG plano).

Se permitió que el proceso hipoglucémico progresase hasta alcanzar la isoelectricidad durante 7, 9 ó 12 min, momento en el que se procedió al rescate de los animales mediante la infusión de glucosa a través de la rápida inserción de un catéter de polietileno por la vena femoral del animal. Esta cirugía duró unos 2-5 min y la glucosa fue infundida a través de una bomba de perfusión (0.2 ml de glucosa 50% seguido de

infusión continua de glucosa 25%, 1.5 ml/h por 3 h) como se describió (Suh et al., 2004). La recuperación de la actividad eléctrica cerebral normal se observó 1 h después de la infusión de glucosa. Estos animales fueron sacrificados 24 h más tarde y, tras la extracción del cerebro, se procedió a la disección de la corteza parietal y el estriado.

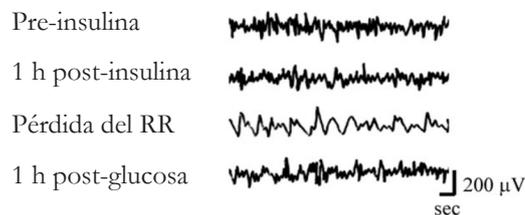


Figura M1. EEG representativo mostrando los cambios en la actividad eléctrica cerebral durante la hipoglucemia. Los electrodos epidurales se implantaron en las ratas una semana antes de la administración de insulina. El día del experimento se realiza un EEG control antes de la administración de insulina y se realiza un seguimiento de la actividad eléctrica hasta que concluye la infusión de glucosa. Durante todo el tiempo de pérdida de reflejo de enderezamiento (*righting reflex*, RR) se registraron ondas de alta amplitud y baja frecuencia. Tras la infusión de glucosa, la actividad eléctrica normal se recupera. Extraído de Haces et al. (2010).

9. Estudio de la viabilidad neuronal mediante ensayo MTT

El ensayo de viabilidad celular en los cultivos de neuronas corticales se fundamenta en la reducción de la sal de tetrazolio MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma-Aldrich) realizada por las enzimas mitocondriales de las células vivas. Al finalizar los tratamientos de los diferentes experimentos, el compuesto MTT fue añadido directamente al medio de cultivo a una concentración de 0.5 mg/ml y, tras 2 h a 37°C, el medio fue sustituido por dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar los cristales de formazán resultantes de la reducción del MTT. A continuación, se cuantificaron los cristales formados mediante espectrometría midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm y sustrayendo el valor de fondo obtenido a 630 nm. Para establecer la contribución de las células gliales presentes en los cultivos mixtos a los valores de viabilidad celular total, cultivos paralelos fueron tratados con NMDA 400 µM y glicina 10 µM durante 24 h y analizados mediante el mismo ensayo. En estas condiciones se consigue la muerte neuronal casi en su totalidad, mientras que las poblaciones no neuronales no se ven afectadas. La sustracción de este valor de absorbancia de cada uno de los datos obtenidos permitió establecer la viabilidad neuronal en las distintas condiciones analizadas. Todas las medidas de viabilidad fueron realizadas por triplicado.

10. Western blot (WB)

Para la preparación de los lisados celulares, tras la finalización de los tratamientos de los diferentes experimentos, los cultivos celulares se lavaron con PBS frío y posteriormente se prepararon extractos proteicos con el tampón de lisis RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (*Complete Protease Inhibitor Cocktail tablets* y *PhosSTOP Phosphatases Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche) durante 30 min en hielo. Posteriormente, con objeto de fragmentar el ADN genómico, los lisados se sometieron a sonicación durante dos ciclos de 30 s a máxima potencia con el aparato Bioruptor (Diagenode), seguido de una centrifugación a 13000 rpm durante 20 min a 4°C para eliminar los restos celulares.

Para la preparación de los extractos proteicos de corteza cerebral de ratón, animales *sham-operated* o sometidos a isquemia cerebral por fototrombosis fueron sacrificados 2.5, 5 ó 24 h después del inicio del

daño isquémico y, una vez extraído y seccionado coronalmente el cerebro, éste fue teñido brevemente con TTC sin fijación. Se procedió entonces a disecar la zona no teñida en el córtex del hemisferio ipsilateral (I) así como su región equivalente en el hemisferio contralateral (C). Las muestras se homogeneizaron posteriormente en tampón RIPA suplementado con SDS 1% e inhibidores de proteasas y fosfatasa. Tras 30 min de incubación a 4°C, los lisados se sometieron a sonicación durante dos ciclos de 30 s a máxima potencia y posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min a esa misma temperatura.

Para la obtención de los extractos proteicos de corteza parietal y estriado de rata, animales control o sometidos a coma hipoglucémico durante 7, 9 ó 12 min fueron sacrificados 24 h después de la infusión de glucosa y, tras la extracción y sección del cerebro, se disecaron la corteza parietal y el estriado. Los extractos proteicos se prepararon utilizando el tampón de lisis para muestras de hipoglucemia suplementado con inhibidores de proteasas. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 12000 rpm durante 20 min a esa misma temperatura.

En todos los casos, la concentración proteica del extracto se cuantificó mediante el reactivo BCA (*Pierce BCA Protein Assay Kit*, Thermo Scientific) y cantidades iguales de proteína fueron desnaturalizadas en tampón de carga a 95°C por 5 min. Cantidades equivalentes de las muestras de proteína así obtenidas (25-50 µg) fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Cuando así se indica, y con el objetivo de analizar fragmentos de bajo peso molecular, se utilizaron geles Bis-Tris, también en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Protran 0.45 µm, Perkin Elmer) sometiéndolas a un campo eléctrico de 400 mA de intensidad durante 70 min (o 100 mA durante 60 min en el caso de los geles Bis-Tris), en tampón de transferencia. Las membranas fueron incubadas seguidamente en solución de bloqueo durante 30 min-1 h a temperatura ambiente (T/A) y con el anticuerpo primario durante toda la noche en la misma solución. La inmunodetección se realizó utilizando anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa preparados también en solución de bloqueo e incubados 1 h a T/A. La detección de esta actividad enzimática se realizó utilizando el reactivo de bioluminiscencia ECL (*Western Lightning Plus-ECL*, Perkin Elmer). La cuantificación densitométrica de las bandas se realizó con el programa de análisis ImageJ. A continuación, los resultados fueron normalizados respecto a los obtenidos para NSE en las mismas muestras y comparados con el valor considerado 100%, indicado en cada caso.

11. Inmunoprecipitación (IP)

Los extractos proteicos (aproximadamente 1 mg) procedentes de cultivos celulares preparados en tampón de lisis para IP fueron incubados durante 1 h a 4°C con 4 µg de anticuerpo específico anti-fosfotirosina (**Tabla M3**). Posteriormente, se añadió 60 µl de proteína A Sefarosa (PAS) preparada al 50% para la precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo y se incubó en agitación durante 1 h a T/A. A continuación las muestras se centrifugaron durante 30 s a 11000 rpm y, tras recoger el sobrenadante, se procedió al lavado de los inmunocomplejos seis veces con el tampón de lisis. Finalmente, se procedió a la desnaturalización de los complejos purificados mediante tampón de carga, fraccionamiento mediante SDS-PAGE e inmunodetección por WB. Cantidades equivalentes de lisado total y del correspondiente sobrenadante tras la IP fueron analizados igualmente en paralelo.

12. Inmunocitoquímica (ICQ)

Los cultivos primarios neuronales se crecieron como se ha descrito anteriormente sobre cubreobjetos pretratados con poli-L-lisina y L-laminina. Al finalizar el tiempo de tratamiento de las células, éstas se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en PB durante 30 min. Tras varios lavados en PB para eliminar los restos de fijador, las células fueron bloqueadas y permeabilizadas en una solución de PB con albúmina sérica bovina (BSA) 1% y Tritón X-100 0.1% por 30 min. A continuación, las células fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en la solución anterior a la concentración indicada en la **Tabla M3**. Posteriormente, tras varios lavados con PB, las células fueron incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos durante 2 h a T/A según lo indicado en la **Tabla M3**. Finalmente, los cristales con las células fijadas se incubaron durante 10 min con DAPI (1:1000 en PB, Life Technologies) y se montaron con Prolong (Life Technologies) sobre portaobjetos. Las imágenes mostradas se adquirieron con un microscopio confocal espectral Leica LSM710 (Zeiss) con un objetivo plan-apocromático de inmersión de 40 aumentos, obteniendo cada uno de los canales de forma separada. Las imágenes que se muestran son secciones individuales de 0.5-1 μm de grosor y fueron procesadas con los programas Zen2009 (Zeiss) e ImageJ.

Los ensayos de inmunofluorescencia en células tratadas previamente con el agente intercalante yoduro de propidio (PI) se realizaron añadiendo al medio este compuesto a una concentración de 50 μM durante los 5 min finales del tratamiento con NMDA. Tras la fijación de las células con PFA 4% en PB durante 30 min en agitación suave, los cristales se lavaron 3 veces con PB y, posteriormente, se trataron con ARNasa 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 30 min a 37°C para disminuir el fondo debido al PI unido al RNA celular. Trascorrido este tiempo, los cristales volvieron a lavarse con PB y posteriormente se realizó el bloqueo y la incubación con el anticuerpo primario y secundario como se ha descrito anteriormente. El PI permitió identificar las células muertas del cultivo, ya que este compuesto es impermeable a la membrana y queda fuera de las células viables.

13. Tinción de Nissl

Tras 24 h de la inducción de la lesión cerebral por fototrombosis, los ratones fueron anestesiados profundamente y sometidos a perfusión intracardiaca con solución salina seguida de PFA 4% en PBS 0.1 M pH 7.4. A continuación, los cerebros fueron extraídos y fijados en la misma solución durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, para preservar la estructura del tejido frente a la congelación, los cerebros se sumergieron en sacarosa 30% preparada en agua, tras lo cual se realizaron secciones coronales de 30 μm de grosor utilizando un criostato (Leica, CM1950). Seguidamente, se realizó la tinción de Nissl para identificar el tejido infartado de la corteza cerebral a través del estudio de su citoarquitectura. Para ello, secciones de tejido se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar al aire durante 24 h. Las preparaciones se sumergieron entonces en una solución de violeta de cresilo 0.1% (p/v) en ácido acético glacial al 0.3% (v/v) durante 13 min. Posteriormente, tras eliminar el exceso de colorante mediante un lavado con agua, las preparaciones se deshidrataron progresivamente en concentraciones crecientes de etanol (70, 96 y 100%) durante 2 min cada una. Finalmente, las muestras se clarificaron con xileno y se preservaron colocando sobre ellas cubreobjetos impregnados con DPX (Sigma-Aldrich).

14. Inmunohistoquímica (IHQ)

Secciones adyacentes a las utilizadas para la tinción de Nissl fueron permeabilizadas y bloqueadas con una solución de PBS 0.1 M con Tritón X-100 0.5% y suero de cabra 10% o suero de caballo 10% durante 1 h a T/A. A continuación, las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios disueltos en la misma solución durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados con PBS, las muestras fueron incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con fluoróforos, preparados también en la solución de bloqueo, durante 2 h a T/A. Posteriormente, la tinción nuclear se obtuvo mediante la incubación durante 10 min con DAPI disuelto en PBS como anteriormente. Tras realizar tres lavados con PBS, las secciones fueron montadas en DPX después de tratarlas con xileno para eliminar el agua. En paralelo, en algunas secciones utilizadas como control se omitió la incubación con los anticuerpos primarios, para confirmar que los niveles de tinción inespecífica eran despreciables. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal como anteriormente.

15. Tinción con Fluoro-Jade C (FJC)

En los ensayos en los que se realizó el marcaje de neuronas en degeneración con el reactivo FJC en combinación con la tinción de los núcleos celulares con el agente intercalante DAPI, se utilizaron secciones adyacentes a las usadas en los ensayos de inmunohistoquímica y, tras bloquearlas como anteriormente, se incubaron con FJC 0.00002% en ácido acético y 0.1% DAPI durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados con agua y se dejaron secar las secciones durante 2 h a 37°C antes de tratarlas con xileno y montarlas finalmente con DPX. Finalmente, las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal como anteriormente.

16. Ensayo de la actividad de promotores

Cultivos primarios neuronales de 12-14 DIVs (1.5×10^5 células/pocillo) fueron transfectados con 0.4 µg del vector reportero, según se detalla en cada caso, usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen-Life Technologies) en medio Neurobasal (ref. 21103-049, Life Technologies) con glutamax. A las 2 h de la adición de los complejos de ADN y liposomas a las células, este medio fue sustituido por medio de cultivo condicionado. La incubación continuó durante 24 h, momento en el que se realizaron los tratamientos indicados en cada caso. Finalizados estos, se prepararon extractos proteicos utilizando el tampón de lisis de Promega (*passive lysis buffer*) en los que se determinó la actividad luciferasa. Todos los ensayos de actividad promotora fueron realizados por cuatriplicado.

17. Transfección transitoria de células HEK293T

Las células HEK293T fueron sembradas en placas p100 y, tras alcanzar una confluencia del 70-80%, el medio fue sustituido por OptiMEM (ref. 31985-047, Life Technologies), con el fin de eliminar el suero presente y mejorar la acción de los liposomas. Las células fueron entonces transfectadas con 10 µg de ADN utilizando Lipofectamina 2000, siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez transcurridas 4 h desde el inicio de la transfección, el medio con ADN/liposomas fue sustituido por medio DMEM suplementado como anteriormente y los cultivos mantenidos a 37°C y 5% CO₂ durante 24-48 h adicionales, momento en

el que se recogieron los extractos proteicos para la realización de los ensayos con calpaína I purificada.

18. Ensayos de digestión *in vitro* con calpaína purificada

Los extractos proteicos se prepararon en tampón RIPA con inhibidores de fosfatasa, como anteriormente, e inhibidores de proteasas específicos para este ensayo: PMSF 1 mM, aprotinina 10 µg/µl y pepstatina A 10 µg/µl. Asimismo, se añadieron al tampón de lisis los agentes quelantes de calcio EGTA y EDTA a una concentración final de 1 mM cada uno. Tras 30 min de incubación a 4°C, los extractos se centrifugaron 20 min a 13000 rpm y se determinó la concentración proteica de la fracción soluble mediante ensayo BCA. Aproximadamente 30 µg de proteína total, diluida en tampón de lisis RIPA para reducir la concentración de los agentes quelantes, fueron incubados en presencia de DTT 5 mM, CaCl₂ 2.5 mM y Tris-HCl 25 mM (pH 8.0) con 25, 50 ó 100 unidades de calpaína I, según se indica en cada caso. La reacción de digestión se llevó a cabo a 37°C durante 15, 30, 60 ó 120 min y se detuvo mediante la adición de tampón de carga de electroforesis y desnaturalización de las muestras a 95°C durante 5 min.

19. Evaluación del volumen del infarto

19.1. Evaluación mediante tinción con TTC

Los animales fueron sacrificados 24 h después del inicio de la lesión y los cerebros fueron extraídos y, tras 10 min de congelación a -20°C, cortados en secciones coronales de 1 mm de grosor utilizando una matriz acrílica (Stoelting). A continuación, las rodajas fueron incubadas en TTC al 2% en PB 0.1 N durante 13 min a 37°C y posteriormente fijadas con PFA al 4% en PB 0.1 N. Las secciones fueron digitalizadas tanto por su cara rostral como caudal y el volumen del infarto fue determinado utilizando el programa ImageJ. Brevemente, tras la calibración de las imágenes, los hemisferios ipsilateral y contralateral, así como la zona de infarto, se delinearón para obtener sus respectivas áreas, a partir de las cuales se calcularon los volúmenes. Una vez corregido el efecto producido por el edema, calculado mediante la comparación de los valores obtenidos para los volúmenes de los hemisferios ipsilateral y contralateral, el volumen de infarto fue expresado como porcentaje respecto al hemisferio cerebral.

19.2. Evaluación mediante RMN

El estudio de RMN fue realizado en el Servicio de Imagen y Espectroscopía por Resonancia Magnética de Alto Campo (SIERMAC) del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”. Los experimentos se realizaron en un equipo Bruker Pharmascan 7T (Bruker Medical GmbH, Ettlingen, Alemania) equipado con un resonador de volumen selectivo de 1H de 23 mm y un gradiente Bruker de 90 mm de diámetro (máxima intensidad 36G/cm). Todos los datos se adquirieron usando una consola Hewlett-Packard con el software Paravision 5.0 (Bruker Medical GmbH) operando en plataforma Linux.

Los animales, sometidos 24 h antes a isquemia cerebral por fototrombosis, se posicionaron en el resonador de volumen y se introdujeron en el centro del imán manteniendo unas condiciones de anestesia continua. Bajo el abdomen del animal, se colocó un sensor de respiración conectado a un sistema de monitorización (SA Instruments, Stony Brook, Nueva York) que permite conocer la frecuencia respiratoria. La anestesia se realizó con una mezcla de oxígeno-isoflurano al 2% en una cámara de inducción y, posteriormente, el flujo

del gas anestésico fue regulado constantemente para mantener un ritmo respiratorio de 50 ± 20 respiraciones por minuto. Se adquirieron imágenes anatómicas *echo* de *spin* pesadas en T2 en orientación axial y coronal, utilizando la secuencia RARE (*Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*) con los siguientes parámetros: tiempo de repetición (TR)= 2500 ms, *echo time* (TE)= 14.7 ms, *averages*= 4, campo de visión= 2.3 mm, matriz de adquisición: 256x256 correspondiendo a una resolución de $90 \times 90 \mu\text{m}^2$, grosor de corte=1 mm consecutivos, número de cortes en imagen axial 16 y en imagen coronal 8.

20. Evaluación de la coordinación motora y el balance

La coordinación motora y el balance fueron evaluados a las 24 h del inicio de la lesión a través del denominado test del equilibrio en barra o *beam walking* (Quinn et al., 2007; Luong et al., 2011) . En esta prueba, el ratón tratará de mantenerse en pie y caminar a través de una estrecha barra de 100 cm de longitud y 10 mm de anchura, elevada 50 cm sobre una mesa, para alcanzar una plataforma segura (una caja negra de dimensiones 150 mm x 150 mm x 150 mm que se coloca como meta al final de la barra). Una fuente de luz (60 watos) se coloca al inicio de la barra y se utiliza como estímulo aversivo para estimular a los animales a huir hacia la meta al otro lado de la barra. El rendimiento en este test se realiza midiendo el número de resbalones de la pata trasera izquierda, afectada por la lesión de la corteza motora del hemisferio derecho, en un tramo interior de la barra de 50 cm previamente señalado.

21. Análisis estadístico

Los resultados procedentes de al menos tres experimentos independientes aparecen representados como los valores de la media y el error estándar de la media (s.e.m.). El análisis estadístico se realizó con el programa *Statistical Package for Social Science* (SPSS, versión 21, IBM). En función del número de grupos, la normalidad de sus datos y la homogeneidad de sus varianzas se utilizaron la prueba *t* de Student desapareada, el análisis de la varianza de un factor o de dos factores (ANOVA) o, caso de existir varios grupos sin varianzas homogéneas, el modelo lineal generalizado (McCulloch and Searle, 2005). En todos los casos, cuando se encontraron diferencias significativas, se usó una prueba de comparaciones múltiples (*post hoc*). Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. Caracterización de la corregulación de la subunidad GluN2A del NMDAR y de la proteína de andamiaje PSD-95 en un modelo celular de excitotoxicidad neuronal

Dada la relevancia que los complejos formados por GluN2A y PSD-95 tienen en la supervivencia neuronal, el procesamiento de estas proteínas puede contribuir enormemente a la muerte neuronal en excitotoxicidad e isquemia (Gascon et al., 2008b). El diseño de terapias capaces de interferir dicho procesamiento y eficaces en la prevención de la excitotoxicidad requiere, por tanto, profundizar en sus mecanismos de regulación. Con objeto de abordar estos estudios, se prepararon cultivos primarios de neuronas corticales de rata, extraídas de embriones de 18 días de gestación, mantenidos durante 13-14 DIVs según se describe en Materiales y Métodos (Rose et al., 1993). Para minimizar el crecimiento de las células gliales, a 7 DIVs se adicionó AraC (10 μ M), agente intercalante del ADN que bloquea la proliferación de las células mitóticas. Estos cultivos mixtos reproducen la composición celular en la corteza cerebral y a 14 DIVs están formados mayoritariamente por neuronas ($73\pm 8\%$; Vidaurre, 2011) y células de glía, fundamentalmente astrocitos. Las neuronas alcanzan un alto grado de maduración y diferenciación, generando neuritas y axones que forman una densa red que recubre toda la superficie de la placa (**Fig. R1A, panel a, cabezas de flecha blancas**) y cuerpos celulares poligonales (**cabezas de flecha negras**).

El proceso de excitotoxicidad se induce mediante la adición al medio de cultivo de concentraciones elevadas de los coagonistas del NMDAR, NMDA (20, 50 ó 100 μ M, según se indica) y glicina (10 μ M). Este tratamiento, al que nos referiremos de manera simplificada como “NMDA”, da lugar a la estimulación conjunta de NMDARs sinápticos y extrasinápticos. La inducción de la excitotoxicidad durante 4 h con las concentraciones de NMDA indicadas produce alteraciones morfológicas evidentes (**Fig. R1A, paneles c-e**), que preceden a la muerte neuronal y son características del proceso de neurodegeneración (Park et al., 1996). Éstas consisten principalmente en la adopción de formas redondeadas y la vacuolización del cuerpo celular (**flechas blancas**), y la degeneración de axones y neuritas con aparición de varicosidades (**flechas negras**). Los cambios morfológicos son progresivamente más evidentes al aumentar la concentración de NMDA y no se observan a 5 μ M (**Fig. R1A, panel b**), condiciones en las que el cultivo mantiene una morfología similar a los no tratados (**Fig. R1A, panel a**).

La viabilidad neuronal en estos cultivos, analizada mediante el ensayo de reducción de la sal de tetrazolio MTT, se vio afectada en paralelo a la aparición de los cambios morfológicos. Los cultivos fueron tratados con NMDA como anteriormente durante 2, 4 ó 6 h y los resultados de 7 experimentos independientes representados como valores relativos respecto a la viabilidad neuronal obtenida en cultivos sin tratar, a los que arbitrariamente se asignó un valor del 100% (**Fig. R1B**). La viabilidad neuronal no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a los cultivos sin tratar a 5 μ M, indicando que dicha concentración de NMDA no induce muerte neuronal. Sin embargo, respecto a los cultivos sin tratar, la viabilidad neuronal disminuyó al $70\pm 4\%$ ($**p<0.01$), $49\pm 9\%$ ($***p<0.001$) y $24\pm 9\%$ ($***p<0.001$) a las 2, 4 y 6 h respectivamente de tratamiento con NMDA 20 μ M. Esta disminución fue más acusada en presencia de NMDA 100 μ M, alcanzándose valores del $62\pm 7\%$ ($***p<0.001$), $23\pm 12\%$ ($***p<0.001$) y $9\pm 10\%$ ($***p<0.001$) a cada uno de los tiempos de tratamiento. Una situación intermedia se obtuvo para la concentración de 50 μ M. Por tanto, la sobreactivación del NMDAR con concentraciones de NMDA superiores a 5 μ M es capaz de inducir el

proceso de muerte neuronal por excitotoxicidad.

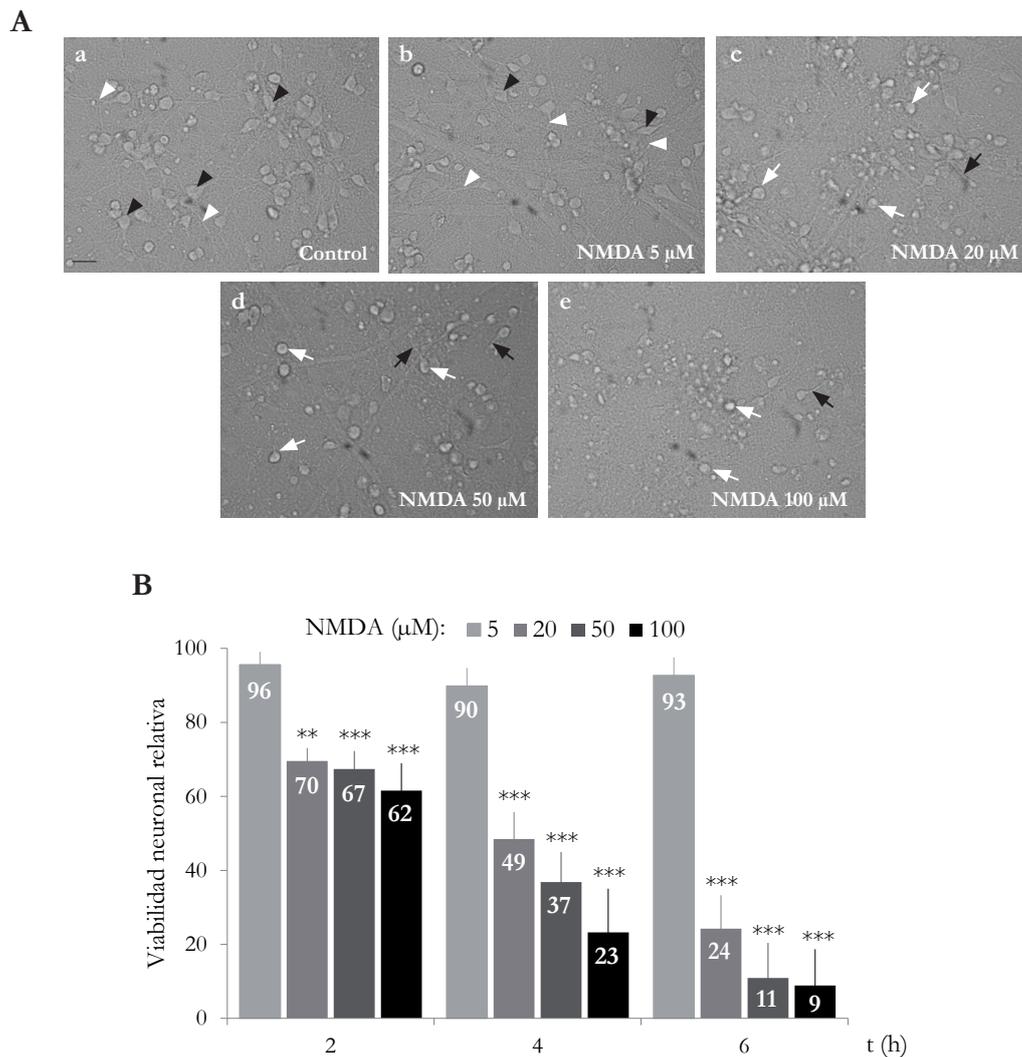


Figura R1. Caracterización del proceso de excitotoxicidad inducido *in vitro* por sobreactivación del NMDAR. **A.** Microscopía de contraste de fases mostrando la morfología de cultivos primarios de neuronas corticales de 14 DIVs utilizados como control (**panel a**) o tratados con los agonistas del NMDAR, NMDA (5, 20, 50 ó 100 μM) y glicina (10 μM) durante 4 h (**paneles b, c, d y e, respectivamente**). Se muestran células con morfología neuronal (puntas de flecha negras) y neuritas (puntas de flecha blancas) típicas para este estadio de maduración *in vitro* que contrastan con los cambios morfológicos característicos del proceso excitotóxico: la vacuolización del soma (flechas blancas), aumento en el volumen celular inducido por la lisis osmótica, la pérdida en número y estructura de las terminaciones dendríticas y axonales con la formación de dilataciones o varicosidades (flechas negras). Barra de escala: 50 μm . **B.** Análisis de la viabilidad neuronal de cultivos incubados con NMDA (5, 20, 50 ó 100 μM) y glicina (10 μM) durante 2, 4 ó 6 h. Los resultados se presentan como valores relativos medios \pm s.e.m. respecto a los obtenidos en cultivos control no tratados con NMDA, a los que arbitrariamente se asignó un valor de 100%. El análisis estadístico se realizó mediante el modelo lineal generalizado (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Control; $n=7$).

Seguidamente estudiamos la corregulación de GluN2A y PSD-95 y su asociación con la sobreactivación del NMDAR. Para ello, en cultivos incubados durante 4 h con las concentraciones anteriores de NMDA, analizamos los niveles de GluN2A y PSD-95 mediante WB con anticuerpos que reconocen secuencias C-terminales de estas proteínas (**Fig. R2A**). El análisis de GluN2A reveló la disminución de la forma completa (FL) y, aunque con dificultad, la aparición de fragmentos C-terminales (fCt). En paralelo, la disminución de PSD-95 (FL) era más progresiva y conllevaba la acumulación de fragmentos con movilidades relativas de aproximadamente 50 y 35 kDa (f50 y f35). El efecto de la sobreactivación de los NMDARs sobre GluN2A y PSD-95 era específico y no una consecuencia de la muerte neuronal, ya que los niveles de otras proteínas como la enolasa específica neuronal (NSE) no sufrían cambios significativos en estas condiciones. Por otra

parte, la aparición de fragmentos estables (BDPs, *breakdown products*) de la espectrina cerebral, un sustrato bien caracterizado de calpaína, puso de manifiesto la activación y acción proteolítica de la enzima. Cuantificamos los niveles de las proteínas GluN2A y PSD-95 completas, normalizando los resultados respecto a los niveles de NSE en esas mismas muestras y representando éstos como valores relativos en relación a los de cultivos control sin tratar. La disminución de GluN2A se hizo patente a la concentración de NMDA 20 μM , alcanzando valores del $55\pm 14\%$ ($***p < 0.001$), y fue más acusada para las concentraciones de 50 y 100 μM (**Fig. R2B**). Sin embargo, decidimos mantener las condiciones empleadas en trabajos anteriores y utilizar la concentración de 20 μM (salvo algunas excepciones que se indican). En cuanto a PSD-95, sus niveles también disminuyeron significativamente a 20 μM ($60\pm 9\%$; $***p < 0.001$; **Fig. R2C**), si bien f50 y f35 no eran claramente detectables en esas condiciones (**Fig. R2A**). Por ello, para PSD-95 decidimos utilizar una concentración mayor de NMDA (50 μM), que disminuye sus niveles hasta el $43\pm 1\%$ ($***p < 0.001$) y favorece la detección de f50 y f35.

A continuación, confirmamos el papel de la calpaína en el procesamiento de ambas proteínas, preincubando los cultivos primarios durante 30 min con una mezcla de los inhibidores de calpaína CiIII (*Calpain inhibitor III*; 10 μM) y calpeptina (10 μM) previamente al tratamiento con NMDA (20 μM , 4 h; **Fig. R2D**). El análisis de la espectrina mostró la inhibición de su procesamiento por los inhibidores, si bien su eficacia no era completa. De manera similar, estos inhibidores fueron capaces de preservar parcialmente los niveles de GluN2A y PSD-95 FL en condiciones de excitotoxicidad, aunque la recuperación parecía mayor para PSD-95 FL y estaba acompañada por una disminución de f50 y f35. Los resultados obtenidos no permiten excluir, sin embargo, la existencia de mecanismos independientes de calpaína contribuyendo a la regulación de GluN2A y PSD-95 en excitotoxicidad. Igualmente, corroboramos que la regulación de estas proteínas se producía mayoritariamente como consecuencia de la sobreactivación específica de la familia de NMDARs (**Fig. R2E**). Para ello, analizamos el efecto del tratamiento con concentraciones excitotóxicas de glutamato (Glu, 100 μM), principal neurotransmisor excitatorio capaz de activar canales iGluRs o mGluRs, o su análogo farmacológico NMDA (100 μM), específico de los NMDARs, junto con glicina (10 μM). Además, analizamos el efecto de un inhibidor específico de las subunidades GluN2B (ifenprodil, 10 μM), un antagonista competitivo del NMDAR (DL-AP5, 200 μM) y dos antagonistas no competitivos (memantina, 10 μM y ketamina 500 μM). Los cultivos fueron preincubados con estos antagonistas (30 min) antes de adicionar al medio los coagonistas del NMDAR, NMDA y glicina (6 h). El análisis de espectrina mostró la activación de calpaína tras el tratamiento con glutamato o NMDA y su inhibición con los distintos antagonistas del NMDAR. Los niveles de NSE no se modificaron significativamente por los tratamientos. Sin embargo, la sobreactivación del NMDAR con glutamato o NMDA produjo una disminución acusada en los niveles de GluN2A y PSD-95 que fue revertida por el pretratamiento con los distintos antagonistas del NMDAR, indicando que la regulación de estas proteínas es inducida específicamente por la sobreactivación de este tipo de receptores.

En conjunto, los datos anteriores muestran que GluN2A y PSD-95 son procesadas en paralelo por calpaína, proteasa activada por la estimulación de los NMDARs con concentraciones de NMDA superiores a 5 μM . En secciones posteriores profundizaremos en los mecanismos específicos de esta regulación, tanto en este modelo celular de excitotoxicidad *in vitro* como en un modelo de isquemia cerebral donde el proceso

de excitotoxicidad ocurre *in vivo*.

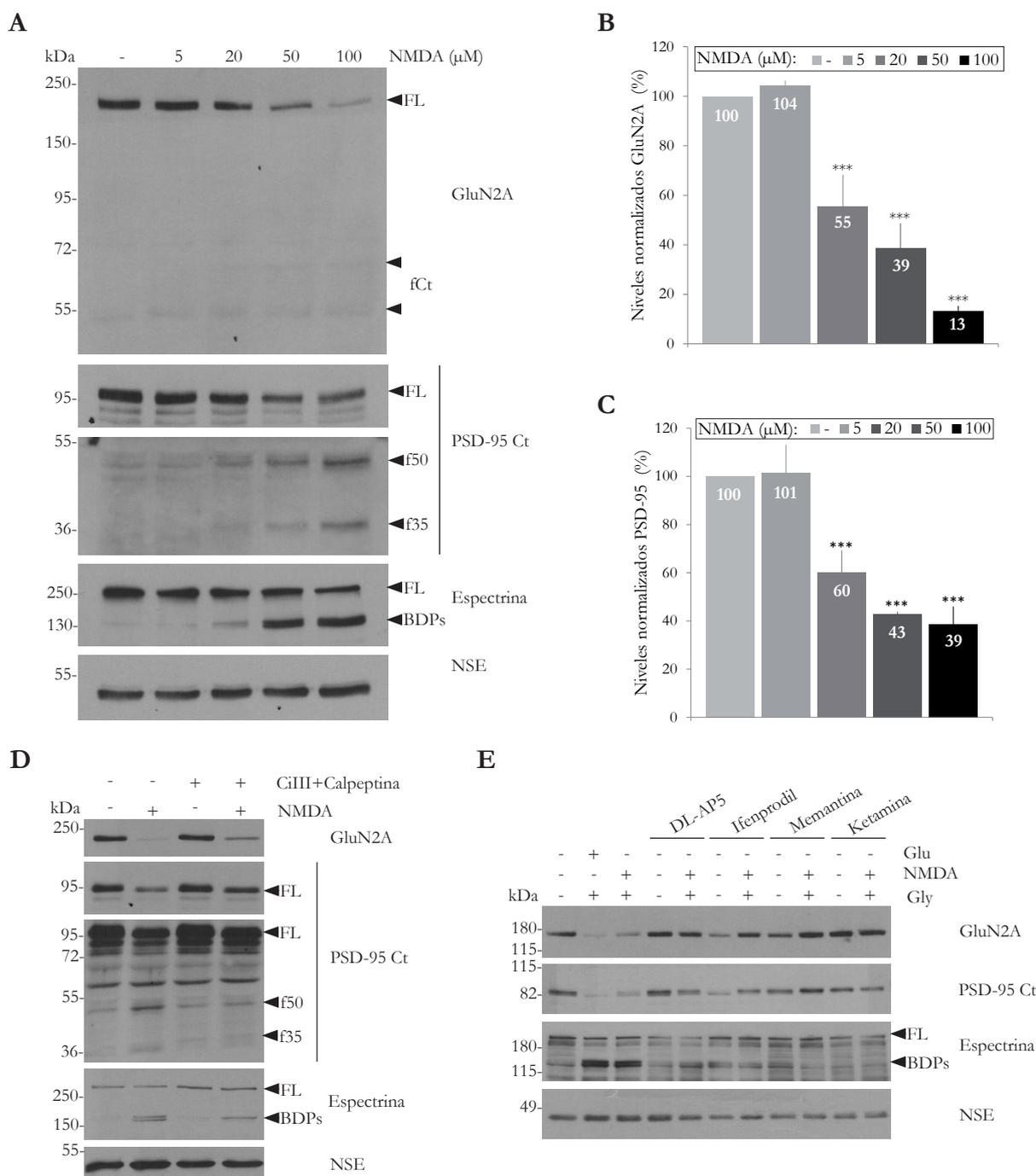


Figura R2. Corregulación de GluN2A y PSD-95 en el modelo celular de excitotoxicidad y prevención de la misma por antagonistas del NMDAR e inhibidores de calpaína. **A.** Análisis por WB del efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de NMDA (5, 20, 50 ó 100 μM) y glicina 10 μM durante 4 h sobre los niveles de GluN2A, PSD-95, espectrina y NSE. La detección de GluN2A se realizó mediante un anticuerpo que reconoce su región C-terminal y permitió observar la formación de fragmentos C-terminales (fCt). El anticuerpo de PSD-95 reconoce una secuencia de su mitad C-terminal (PSD-95 Ct; ver figura R5A) y permitió detectar fragmentos de 50 y 35 kDa (f50 y f35, respectivamente) tras la sobreexposición de las membranas quimioluminiscentes. Se detectó la espectrina cerebral en su forma completa (FL) y los productos derivados de su procesamiento por calpaína de 145 y 150 kDa (BDPs), así como la proteína neuronal NSE, que no es sustrato de calpaína. **B y C.** Cuantificación de los niveles de GluN2A y PSD-95, respectivamente, mediante densitometría de las bandas y normalización respecto a los niveles de NSE. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el modelo lineal generalizado, comparando los niveles obtenidos en los cultivos tratados con las distintas concentraciones de NMDA con los cultivos no estimulados (***) $p < 0.001$; $n = 3-5$). **D.** Estudio de la participación de la calpaína en el procesamiento de GluN2A y PSD-95. Los cultivos fueron preincubados con los inhibidores específicos de calpaína CiIII (10 μM) y calpeptina (10 μM) durante 30 min previamente al tratamiento con NMDA 20 μM durante 4 h. Como anteriormente, se muestra la sobreexposición del WB de PSD-95 Ct. **E.** Efecto de diferentes agonistas y antagonistas del NMDAR sobre el procesamiento de GluN2A y PSD-95 inducido en excitotoxicidad. Los cultivos se preincubaron con los antagonistas DL-AP5 (200 μM), ifenprodil (10 μM), memantina (10 μM) o ketamina (500 μM) durante 30 min y posteriormente fueron tratados con glutamato o NMDA (100 μM) durante 6 h.

2. Validación de un modelo de isquemia focal permanente para la caracterización *in vivo* del procesamiento de GluN2A y PSD-95 y el análisis de las herramientas de neuroprotección desarrolladas

Los resultados anteriores del grupo acerca de la regulación de las proteínas GluN2A y PSD-95 en procesos de excitotoxicidad *in vivo* se obtuvieron utilizando un modelo en rata de isquemia focal transitoria inducida por oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) (Gascon et al., 2008b). Para profundizar en estos estudios, en esta Tesis decidimos utilizar un modelo alternativo que facilitara el análisis de las herramientas neuroprotectoras que planeábamos desarrollar. Elegimos un modelo de isquemia focal permanente inducida en ratón por fototrombosis (Schroeter et al., 2002), muy reproducible y relativamente más sencillo que el anterior. En este modelo se induce una lesión cortical mediante la administración por vía i.v. de un compuesto fotosensible (Rosa de Bengala) y la posterior irradiación de la zona cerebral escogida con una fuente de luz

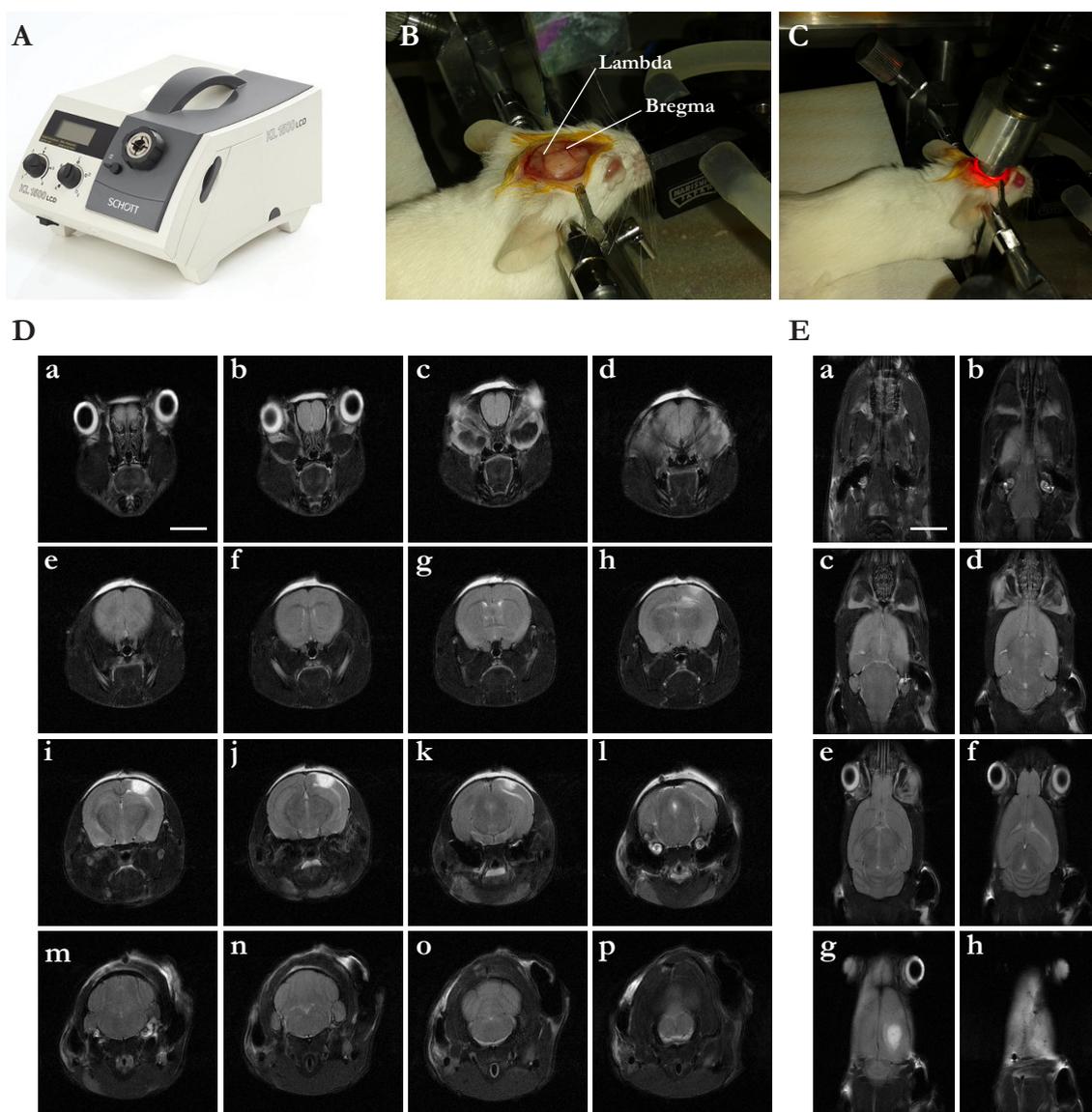


Figura R3. Validación del modelo murino de isquemia cerebral permanente por fototrombosis. **A.** Fuente de luz fría usada para la inducción del daño endotelial o fototrombosis. **B.** Identificación de los puntos anatómicos de referencia Bregma y Lambda sobre el cráneo del ratón. Respecto a Bregma, se establecen las coordenadas estereotáxicas para la irradiación. **C.** Irradiación con luz fría transmitida por un haz de fibra óptica de la superficie del cráneo de un animal sometido a isquemia cerebral por fototrombosis. **D y E.** Imágenes de RMN 24 h después de la inducción del daño que muestran la localización del infarto generado en planos axiales y coronales, respectivamente. En este experimento, la lesión se indujo en las coordenadas -2 AP +3 ML mediante 15 min de irradiación con un haz de fibra óptica de \varnothing 2.25 mm. Barra de escala: 5 mm.

fría (**Fig. R3A**). Previamente es necesario realizar una incisión medial del tejido pericraneal e identificar los puntos anatómicos de referencia en el cráneo del animal, Bregma y Lambda (**Fig. R3B**), respecto a los cuales se selecciona mediante estereotaxia el punto de incidencia del haz de fibra óptica que transmite la luz fría (**Fig. R3C**). Este modelo es poco invasivo, ya que no requiere craneotomía al inducirse el daño endotelial a través del cráneo mediante la irradiación de la vasculatura subyacente del área seleccionada. Además, permite elegir de manera muy precisa la localización de la región cortical a lesionar así como modular la intensidad del daño (revisado en Braeuning and Kleinschnitz, 2009). Estudios de RMN realizados 24 h después de la inducción del daño (coordenadas -2 AP, +3 ML, 15 min de irradiación con un haz de fibra óptica de \varnothing 2.25 mm) permitieron comprobar la presencia de una región infartada en la corteza cerebral, visualizada tanto en planos axiales (**Fig. R3D, paneles h-k**) como coronales (**Fig. R3E, panel g**) dentro de la corteza somatosensorial del hemisferio derecho. El análisis por RMN de estos mismos animales 72 h después de la inducción del daño no indicó un aumento en el volumen de la región infartada (datos no mostrados), señalando que en este modelo la progresión del infarto se estabiliza alrededor de las 24 h. Posteriormente a estos experimentos de puesta a punto, y con objeto de poder evaluar funcionalmente a estos animales, generamos los infartos dentro de la corteza motora del mismo hemisferio (coordenadas +0.2 AP, +2 ML).

Las lesiones producidas en animales sacrificados a las 24 h también fueron claramente detectables a simple vista (**Fig. R4A**) o después de la tinción del cerebro con colorantes vitales como el TTC (**Fig. R4B**).

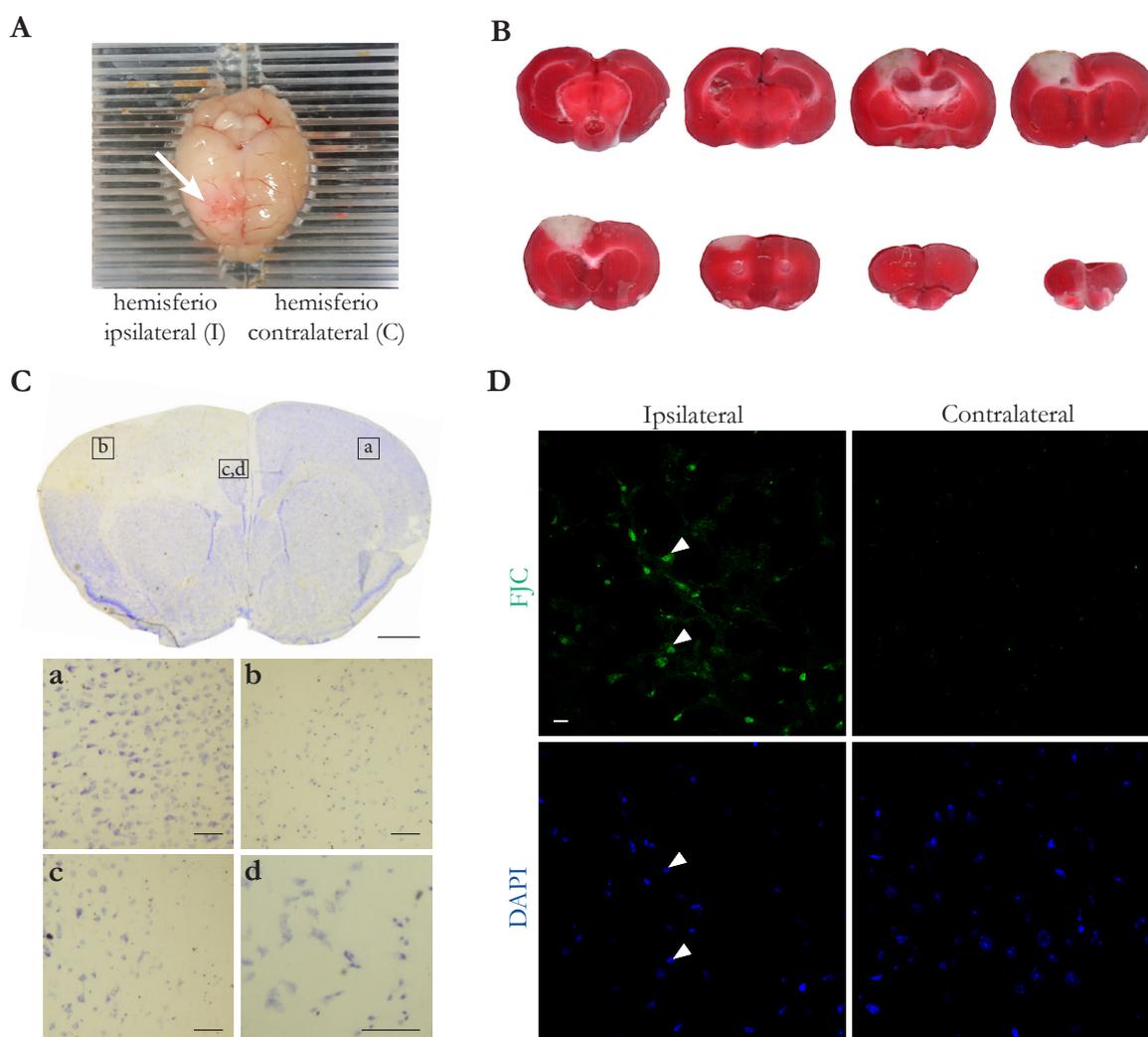


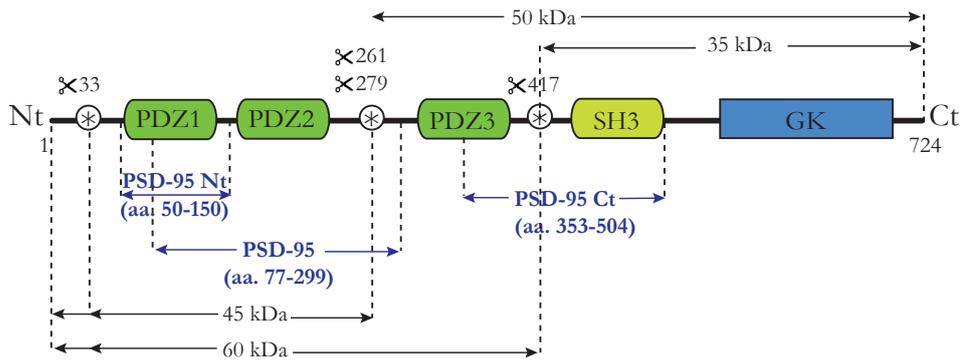
Figura R4. Análisis del daño neuronal inducido en el modelo de isquemia cerebral permanente por fototrombosis. **A.** Cerebro de ratón sacrificado 24 h después de la inducción del daño y colocado en una matriz acrílica para ser seccionado y teñido. El infarto puede visualizarse como una zona pálida en el tejido (flecha blanca). Se señalan el hemisferio ipsilateral (I, que contiene el infarto) y contralateral (C, en el lado opuesto). **B.** Secciones coronales de 1 mm de grosor teñidas con el colorante vital TTC. Se observan regiones metabólicamente activas (rojo) que contrastan con la región infartada, que se visualiza como una zona no teñida (blanca) en la corteza del hemisferio ipsilateral. **C.** Tinción de Nissl de una sección coronal (30 μm) de cerebro de ratón sometido al procedimiento anterior, donde se visualiza el tejido infartado como una zona hipocromática en el hemisferio ipsilateral en comparación con la región equivalente del hemisferio contralateral. Barra de escala: 1 mm. Se presentan ampliaciones de regiones representativas donde se muestra la citoarquitectura de la región contralateral (**panel a**), la zona infartada (**panel b**) y la zona de transición entre la región lesionada y el tejido no isquémico (**paneles c y d**). Barra de escala: 20 μm . **D.** Tinción de una sección coronal (30 μm) de cerebro de ratón, sometido al mismo procedimiento, con el marcador de degeneración neuronal FJC (verde). Se realizó también el marcaje de los núcleos celulares con el agente intercalante DAPI (azul). Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal y los canales se muestran por separado. Barra de escala: 10 μm . En estos experimentos la lesión se indujo en las coordenadas +0.2 AP +2 ML mediante 10 min de irradiación con un haz de fibra óptica de \varnothing 1.5 mm.

Tras la extracción del cerebro, utilizamos una matriz acrílica (**Fig. R4A**) para preparar secciones coronales de 1 mm de grosor que, una vez teñidas con TTC, mostraron la región infartada como una zona no teñida en el córtex del hemisferio ipsilateral que contrasta con la región equivalente del hemisferio contralateral (**Fig. R4B**). La región infartada también fue claramente distinguible como una zona hipocromática en la tinción de Nissl (**Fig. R4C, panel superior**). Un análisis detallado mostró importantes cambios morfológicos en las células de la zona infartada que, a diferencia del típico granulado basofílico del citoplasma y núcleos con contorno oval o redondeado propios de las células no lesionadas (**Fig. R4C, panel a**), aparecían retraídas y con picnosis nuclear (**Fig. R4C, panel b**). Este contraste se apreciaba más claramente en las zonas de transición entre la región dañada y el tejido no isquémico (**Fig. R4C, paneles c y d**). Adicionalmente, a las 24 h de daño detectamos la existencia de neurodegeneración en la región infartada mediante tinción con el marcador específico de estos procesos, FJC (**Fig. R4D**). En contraste con la correspondiente región no dañada de la misma sección, detectamos marcaje neuronal con FJC en la región infartada. Además, la tinción del ADN con el agente intercalante DAPI mostraba células en proceso de muerte que presentaban núcleos retraídos.

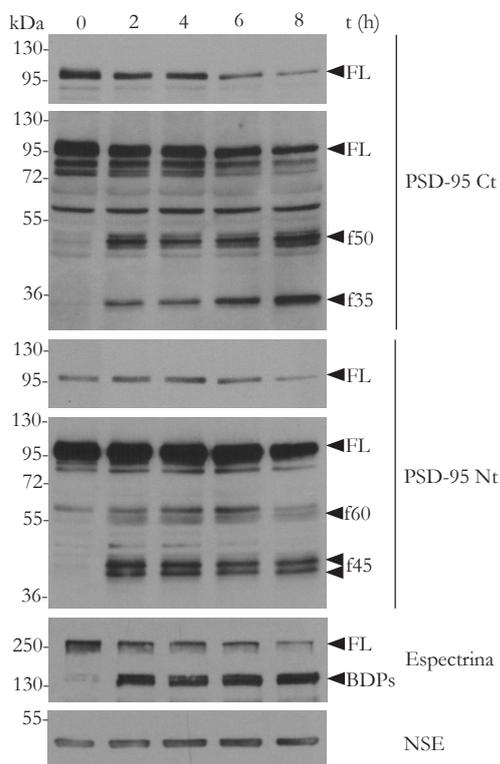
3. Caracterización del procesamiento de PSD-95 en el modelo *in vitro* de excitotoxicidad

El trabajo anterior de nuestro laboratorio determinó las secuencias de corte por calpaína de PSD-95 mediante la secuenciación por la técnica de Edman de los extremos N-terminales de los fragmentos resultantes de su procesamiento (Vidaurre, 2011) (**Fig. R5A**). En general, estas predicciones coincidían con los fragmentos observados experimentalmente en los cultivos neuronales sometidos a excitotoxicidad (Vidaurre, 2011). Con el objetivo de profundizar en el mecanismo de regulación de PSD-95, estudiamos la cinética del procesamiento en cultivos tratados con NMDA (50 μM) durante distintos tiempos (2, 4, 6 y 8 h) (**Fig. R5B**). Comparamos los fragmentos detectados con el anticuerpo utilizado anteriormente, PSD-95 Ct (aa. 353-504 en la mitad C-terminal de la proteína), con los obtenidos con un anticuerpo dirigido a su región N-terminal (aa. 50-150, PSD-95 Nt). Ambos anticuerpos revelaron la disminución de la forma PSD-95 FL, y la aparición y acumulación progresiva de fragmentos de menor tamaño molecular (**Fig. R5B**): f50 y f35 visualizados con PSD-95 Ct, descritos anteriormente, y fragmentos próximos a 60 kDa (f60) y 45 kDa (f45) para PSD-95 Nt. Los resultados eran coherentes con un procesamiento parcial de PSD-95 en cada una de las cuatro secuencias establecidas previamente, dando lugar a productos intermedios como los f50, formados cuando el procesamiento en el aminoácido 417 es deficiente, o los f60, cuando fallan los cortes en 261 y

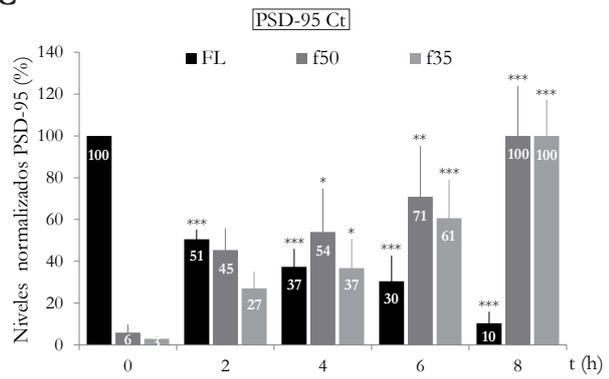
A



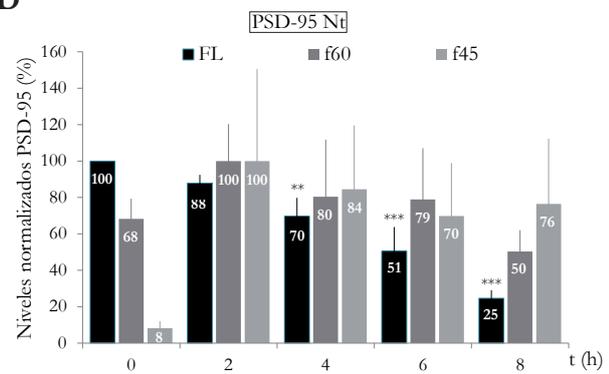
B



C



D



E

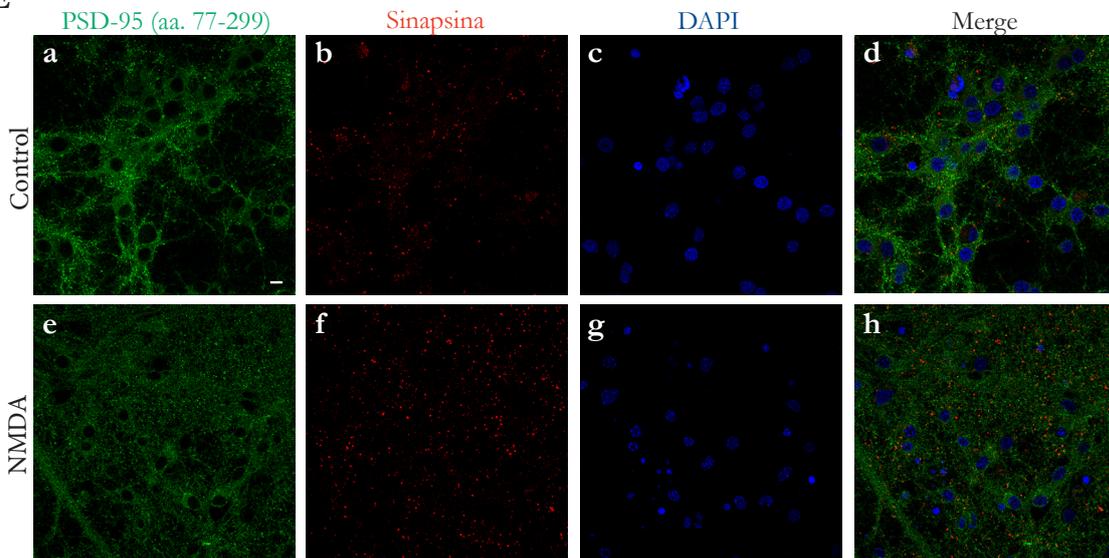


Figura R5. Procesamiento de PSD-95 en el modelo celular de excitotoxicidad. **A.** Esquema de la estructura en dominios de PSD-95 con indicación de los sitios de corte por calpaína identificados mediante la técnica de degradación de Edman (asteriscos). Se señala la posición aminoacídica donde se realizaría el corte por calpaína (tijeras) y los tamaños teóricos de los fragmentos generados (flechas negras). Asimismo, se indican las secuencias aminoacídicas reconocidas por los tres anticuerpos utilizados en este trabajo (flechas azules). **B.** Análisis por WB del efecto temporal del tratamiento con NMDA 50 μ M sobre los niveles de PSD-95, espectrina y NSE en cultivos primarios (14 DIVs). El procesamiento de PSD-95 se analiza mediante los anticuerpos PSD-95 Ct y PSD-95 Nt, que detectan la proteína en su forma completa (FL) y los fragmentos resultantes (f50 y f35, o f60 y f45, respectivamente). **C y D.** Cuantificación de la cinética de regulación de PSD-95-FL y sus fragmentos mediante análisis densitométrico utilizando los anticuerpos PSD-95 Ct y PSD-95 Nt, respectivamente. Los valores se normalizan respecto a los de NSE y están representados como porcentaje en relación al valor máximo obtenido, al que se asignó arbitrariamente el valor 100% (cultivos sin estimular para PSD-95-FL, 8 h para f50 y f35, 2 h para f60 y f45). Se representan valores medios \pm s.e.m. de 3-4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante el modelo lineal generalizado (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001). **E.** Doble inmunofluorescencia de cultivos primarios de 14 DIVs sin tratar o estimulados con NMDA 50 μ M durante 4 h utilizando el anticuerpo específico de PSD-95 que reconoce los aa. 77-299 (verde) y el de sinapsina (rojo). Las células se tiñeron además con el agente intercalante DAPI (azul) para visualizar los núcleos. Las imágenes son secciones individuales obtenidas mediante microscopía confocal en las que se muestran los tres canales por separado (**paneles a, b, c, e, f y g**) o fusionados (**paneles d y h**). Barra de escala: 10 μ m.

279 (**Fig. R5A**). La aparición de los BDPs de espectrina puso en evidencia la activación de la calpaína desde tiempos muy tempranos del tratamiento con NMDA, mientras que NSE no mostró cambios aparentes. Seguidamente, cuantificamos como anteriormente los niveles de proteína completa y de sus fragmentos de procesamiento en 4 experimentos independientes realizados con los anticuerpos PSD-95 Ct y Nt (**Figs. R5C y D**, respectivamente). Para PSD-95 FL, los valores normalizados fueron referidos a los obtenidos en las células sin tratar, mientras que para los fragmentos los valores normalizados se expresaron como porcentajes relativos respecto del nivel máximo alcanzado, al que arbitrariamente asignamos un valor del 100% (8 h para f50 y f35, 2 h para f60 y f45). La disminución de PSD-95 FL inducida por el tratamiento con NMDA observada con ambos anticuerpos parece ser más lenta que la de espectrina, sugiriendo que PSD-95 es peor sustrato de calpaína. Con PSD-95 Ct, los niveles de f50 y f35 incrementaron con el tratamiento hasta las 8 h, si bien el aumento de f50 parecía ir por delante del de f35 en consonancia con la relación sustrato-producto existente entre ambos. Así, f50 alcanzó valores de $54 \pm 21\%$ (* p <0.05) y $71 \pm 24\%$ (** p <0.01) respectivamente a las 4 y 6 h mientras que los niveles normalizados de f35 eran tan solo del $37 \pm 14\%$ (* p <0.05) y $61 \pm 18\%$ (** p <0.001) a esos mismos tiempos. Además, la acumulación progresiva de ambos fragmentos sugiere una alta estabilidad de los mismos en condiciones excitotóxicas. Atendiendo a los resultados obtenidos con PSD-95 Nt, los niveles normalizados de f60 y f45, máximos a las 2 h como se mencionó, decayeron a partir de ese tiempo. Así, los niveles de f60 a 8 h de tratamiento eran del $50 \pm 12\%$ respecto a los obtenidos a las 2 h, posiblemente debido a un procesamiento ulterior de este producto intermedio para dar f45.

A continuación, analizamos mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal la distribución de PSD-95 en las neuronas y los cambios ocasionados por la estimulación excitotóxica. Utilizamos un anticuerpo monoclonal de PSD-95 (aa. 77-299; **Fig. R5A**) que produce buenos resultados en esta técnica. En condiciones basales, los cultivos mostraron un patrón de PSD-95 extendido por prácticamente la totalidad de la neurona (**Fig. R5E, panel a**). La estimulación con NMDA (50 μ M, 2 h) indujo una reducción en los niveles de PSD-95 (**Fig. R5E, panel e**) paralela a una retracción de los núcleos (**Fig. R5E, panel g**) en comparación con las células no estimuladas (**Fig. R5E, panel c**). La cotinción con un anticuerpo específico para sinapsina no mostró diferencias importantes para esta proteína (**Fig. R5E, paneles b y f**).

En conjunto, los experimentos anteriores muestran el procesamiento parcial de PSD-95 en condiciones de excitotoxicidad *in vitro* como resultado de la activación de calpaína, que reconoce en su sustrato secuencias anteriormente identificadas por el método de Edman y produce fragmentos estables incluso en fases avanzadas del daño neuronal.

4. Caracterización del procesamiento de PSD-95 en el modelo de isquemia cerebral permanente inducida por fototrombosis

Cara a establecer las condiciones más apropiadas para analizar las herramientas neuroprotectoras que pretendíamos desarrollar para prevenir el procesamiento de PSD-95, era importante caracterizar previamente la cinética de regulación de esta proteína en el modelo de isquemia permanente. Analizamos diferentes niveles de daño neuronal en animales sacrificados 2.5, 5 ó 24 h tras la inducción de la lesión, comparando el tejido isquémico aislado del hemisferio ipsilateral (I) y la región cortical equivalente en el hemisferio contralateral (C), usada como control interno. Como control adicional, se analizaron regiones equivalentes de la corteza cerebral de animales *sham-operated*, es decir, sometidos a todo el proceso excepto a la irradiación

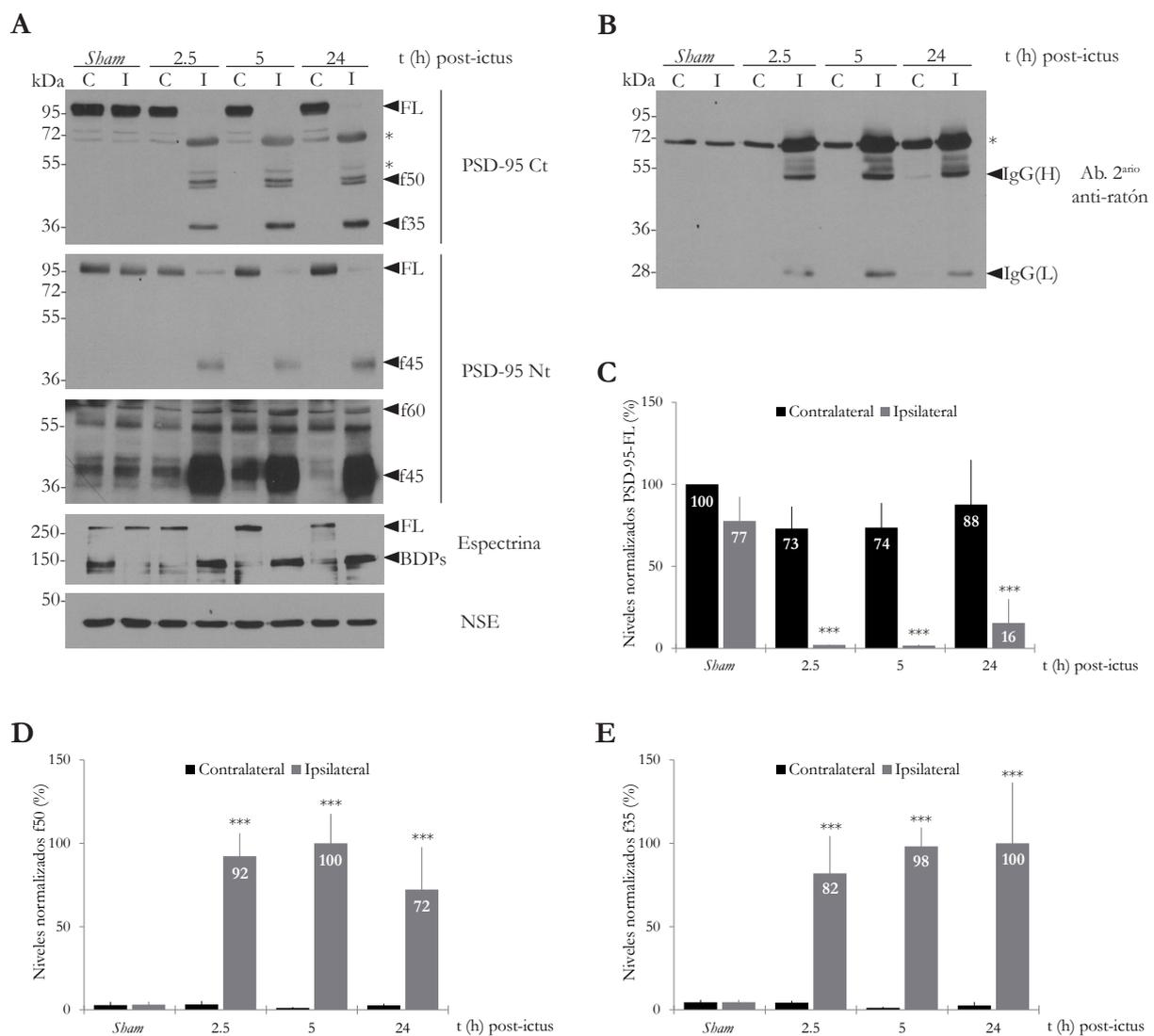


Figura R6. Regulación de PSD-95 en el modelo de isquemia cerebral permanente por fototrombosis. **A.** Estudio por WB de los niveles de PSD-95 en extractos de cerebro de ratones sacrificados 2.5, 5 ó 24 h tras la inducción del daño comparados con ratones *sham-operated*. Las muestras corresponden a regiones infartadas de la corteza cerebral ipsilateral (I) o áreas equivalentes en el hemisferio contralateral (C). Con objeto de estudiar la formación de f60, se presentan dos exposiciones del WB con PSD-95 Nt. **B.** Análisis de las muestras anteriores con un anticuerpo secundario anti-ratón en ausencia de anticuerpo primario. Se detectan diversas proteínas en la región ipsilateral (asteriscos), incluyendo inmunoglobulinas, indicativas de la apertura de la BHE. **C.** Cuantificación de los niveles de PSD-95-FL en experimentos similares al del panel A (n=3). Los niveles obtenidos por densitometría se normalizaron respecto a NSE y se representan como valores relativos respecto al valor medio obtenido en el hemisferio contralateral de los animales *sham-operated*, al que se le asigna un valor arbitrario del 100% (***) $p < 0.001$). **D y E.** Cuantificación de los niveles de f50 y f35, respectivamente, en animales tratados como anteriormente (n=3). Los resultados se representan como porcentaje relativo al valor máximo obtenido en el hemisferio ipsilateral, al que se asignó arbitrariamente el valor 100% (5 h para f50, 24 h para f35). Se representan valores medios \pm s.e.m. y, en todos los casos, el análisis estadístico se realizó mediante el modelo lineal generalizado (***) $p < 0.001$.

con la luz fría (**Fig. R6A**). El anticuerpo PSD-95 Ct mostró el procesamiento casi completo de PSD-95 y la formación de f50 y f35 en el tejido dañado desde tiempos muy tempranos (2.5 h) tras la inducción del proceso de excitotoxicidad *in vivo*. De forma paralela, PSD-95 Nt demostró la formación temprana en el tejido infartado de f60 y f45, aunque los niveles de f60 solo eran detectables en condiciones de sobreexposición. Este resultado sugiere un procesamiento mucho más eficiente en la secuencia 261-279 respecto a 417 *in vivo*, que explicaría la coexistencia de f45, f50 y f35 en el tejido isquémico y la práctica ausencia de f60. La activación temprana de la calpaína fue confirmada mediante el análisis de la espectrina cerebral. Por último, los resultados obtenidos con PSD-95 Ct, un anticuerpo de ratón, sugieren la apertura de la BHE desde tiempos muy tempranos de daño y la detección en el tejido isquémico de proteínas distintas de PSD-95 (**Figs. R6A, asteriscos**), incluyendo inmunoglobulinas, también detectables en WBs control realizados solo con anticuerpos secundarios (**Figs. R6B**). Cuantificamos PSD-95 en tres animales por grupo, normalizando los resultados respecto a NSE y relativizándolos frente a los obtenidos en la región contralateral de los animales *sham-operated*, a los que se asignó arbitrariamente un valor del 100% (**Fig. R6C**). Los niveles de PSD-95 FL sufrieron un descenso estadísticamente significativo en las regiones isquémicas respecto a la región contralateral equivalente a todos los tiempos analizados. Así por ejemplo, a las 2.5 h de daño, PSD-95 alcanzó valores del $2\pm 0.4\%$ frente al $73\pm 13\%$ en la región no infartada ($***p < 0.001$). Cuantificamos también los niveles normalizados de f50 (**Fig. R6D**) y f35 (**Fig. R6E**), relativizados respecto al valor promedio máximo correspondiente (5 h para f50 y 24 h para f35). A pesar de la variabilidad intra-grupo, la cuantificación mostró una acumulación significativa de ambos fragmentos de PSD-95 en función de la duración del daño.

El análisis por inmunohistoquímica y microscopía confocal de secciones coronales consecutivas de animales sacrificados 5 h después de la inducción del daño reveló un claro descenso de la señal de PSD-95 en la región isquémica en comparación con la región equivalente del hemisferio contralateral (**Fig. R7A**). Esta disminución era paralela a la detección en secciones contiguas de neuronas en la región infartada que sufren

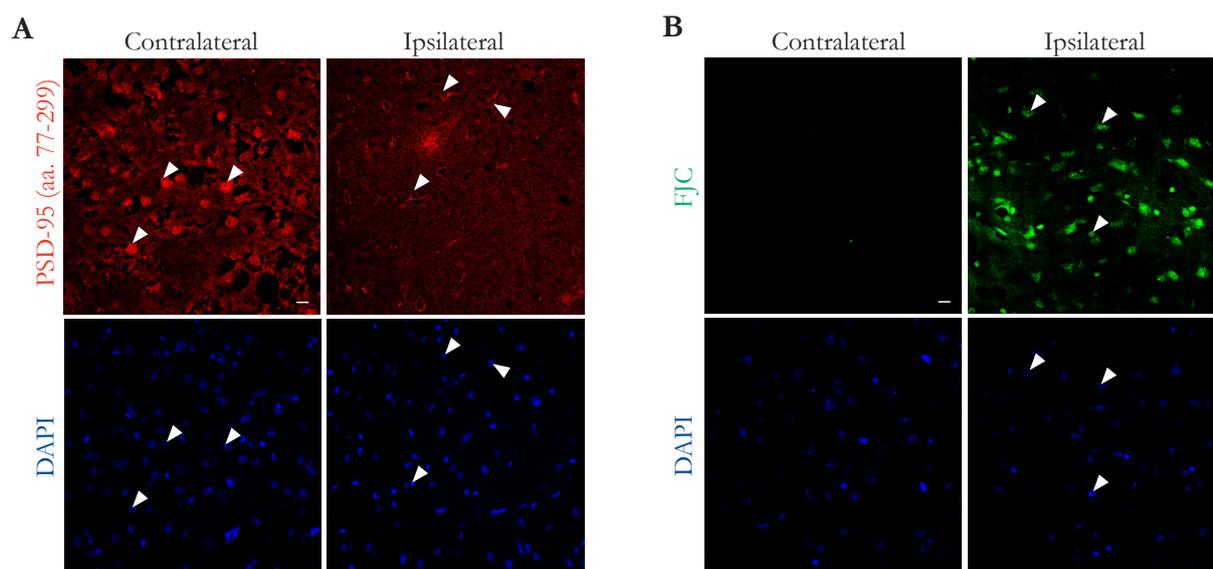


Figura R7. Análisis mediante inmunohistoquímica del procesamiento de PSD-95 en el modelo de isquemia cerebral permanente. Secciones coronales (30 μm) de cerebro de ratón sometido a isquemia cerebral permanente y sacrificado 5 h después del inicio de la lesión. Se muestran imágenes representativas de las tinciones obtenidas en la región isquémica y el área equivalente en el hemisferio contralateral en secciones consecutivas. **A.** Tinción de PSD-95 (rojo) y núcleos celulares (DAPI, azul). Se señalan células que expresan PSD-95 y sus correspondientes núcleos (puntas de flecha blancas). **B.** Marcaje de neuronas en degeneración con el marcador FJC (verde). Se señalan neuronas en degeneración en el hemisferio ipsilateral y sus correspondientes núcleos (puntas de flecha blancas). La regulación negativa de PSD-95 en el hemisferio ipsilateral se correlaciona con la condensación nuclear y el marcaje de neuronas en proceso de muerte. Barra de escala: 10 μm .

neurodegeneración y se tiñen específicamente con FJC (**Fig. R7B**).

En conjunto, los experimentos anteriores demuestran que, en un modelo de isquemia cerebral permanente, la excitotoxicidad *in vivo* da lugar a un procesamiento muy eficiente y temprano de PSD-95, siendo 2.5 h de daño suficientes para la casi total desaparición de la proteína. El procesamiento entre los dominios PDZ2 y PDZ3 de PSD-95 tiene mayor eficiencia que entre PDZ3 y SH3, conduciendo a la formación de fragmentos mayoritarios de 35, 45 y 50 kDa que permanecen de manera estable en el tejido isquémico incluso en fases muy avanzadas de la lesión.

5. Regulación de PSD-95 en un modelo de daño cerebral moderado inducido por hipoglucemia

Seguidamente, nos interesó estudiar si la regulación de PSD-95 también ocurría en un modelo de daño cerebral moderado asociado con excitotoxicidad, que podría proporcionar una alternativa para la caracterización de los péptidos neuroprotectores respecto al modelo de isquemia permanente, mucho más severo. Para ello, en el marco de una colaboración con la Dra. L. Massieu (Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Méjico), utilizamos un modelo de hipoglucemia inducida en rata con insulina. Esta hormona provoca una disminución progresiva de la concentración sanguínea de glucosa que termina induciendo un estado de coma o periodo isoelectrico, reversible mediante la administración de este azúcar. Como vimos, la duración del coma hipoglucémico va a determinar la intensidad de la lesión cerebral (Auer et al., 1984a).

Analizamos muestras correspondientes a dos de las regiones cerebrales más vulnerables, corteza parietal (**Fig. R8A y B**) y estriado (**Fig. R8C y D**), de animales sometidos a hipoglucemia con distintos periodos isoelectricos (Iso; 7, 9 ó 12 min), rescatados seguidamente con glucosa y sacrificados a las 24 h. El análisis se centró en la detección de los fragmentos característicos del procesamiento de PSD-95 y espectrina en respuesta a la privación de glucosa ya que, al tratarse de un modelo de daño neuronal moderado, era un criterio mucho más sensible que la detección de la disminución en los niveles de las formas completas de estas proteínas. En la corteza parietal observamos que, a diferencia de lo que ocurría en los controles (C1-C3), los animales que experimentaron hipoglucemia con coma (Iso1-Iso6) mostraban la acumulación progresiva de los fragmentos f45, f50 y f35 de PSD-95 en paralelo al procesamiento de la espectrina (**Fig. R8A**). En líneas generales, los niveles de estos fragmentos de PSD-95 eran proporcionales a la duración del coma (7 min: Iso1, Iso2; 9 min: Iso3, Iso4; 12 min: Iso5, Iso6). Como anteriormente, f60 no pudo ser detectado, sugiriendo de nuevo un procesamiento más eficiente de la secuencia 261-279 frente a 417. Para espectrina observamos cierta inestabilidad de sus BDPs en los animales sometidos a los tiempos de coma más largos debido, quizás, al avanzado estado de daño en el tejido. Los niveles de fragmentos de espectrina y PSD-95 fueron cuantificados en los animales control (C1-C3) o sometidos a hipoglucemia (Iso1-Iso6), normalizados frente a NSE y expresados como valores relativos respecto a los de animales control, a los que arbitrariamente se asignó un valor de 1 (**Fig. R8B**). En la corteza parietal, los niveles de f45, f50, f35 y de los BDPs de espectrina aumentaron significativamente en los animales que habían sufrido hipoglucemia, alcanzándose valores de 3.1 ± 0.6 ($*p < 0.05$), 3.1 ± 0.3 ($**p < 0.01$), 8.6 ± 1.8 ($*p < 0.05$) y 3.3 ± 0.3 ($**p < 0.01$) respectivamente frente a los controles. Los resultados fueron más sutiles para las muestras de estriado (**Fig. R8C**) donde los niveles de fragmentos solo mostraron diferencias estadísticamente significativas en el caso de f50 y de los

BDPs de espectrina (**Fig. R8D**). Este resultado apunta a un procesamiento menor de PSD-95 en estriado que en corteza parietal, probablemente debido a que en hipoglucemia esa región presenta alrededor de un tercio de células dañadas (Langurén et al., datos no publicados) respecto a la corteza parietal (Julio-Amilpas et al., 2015).

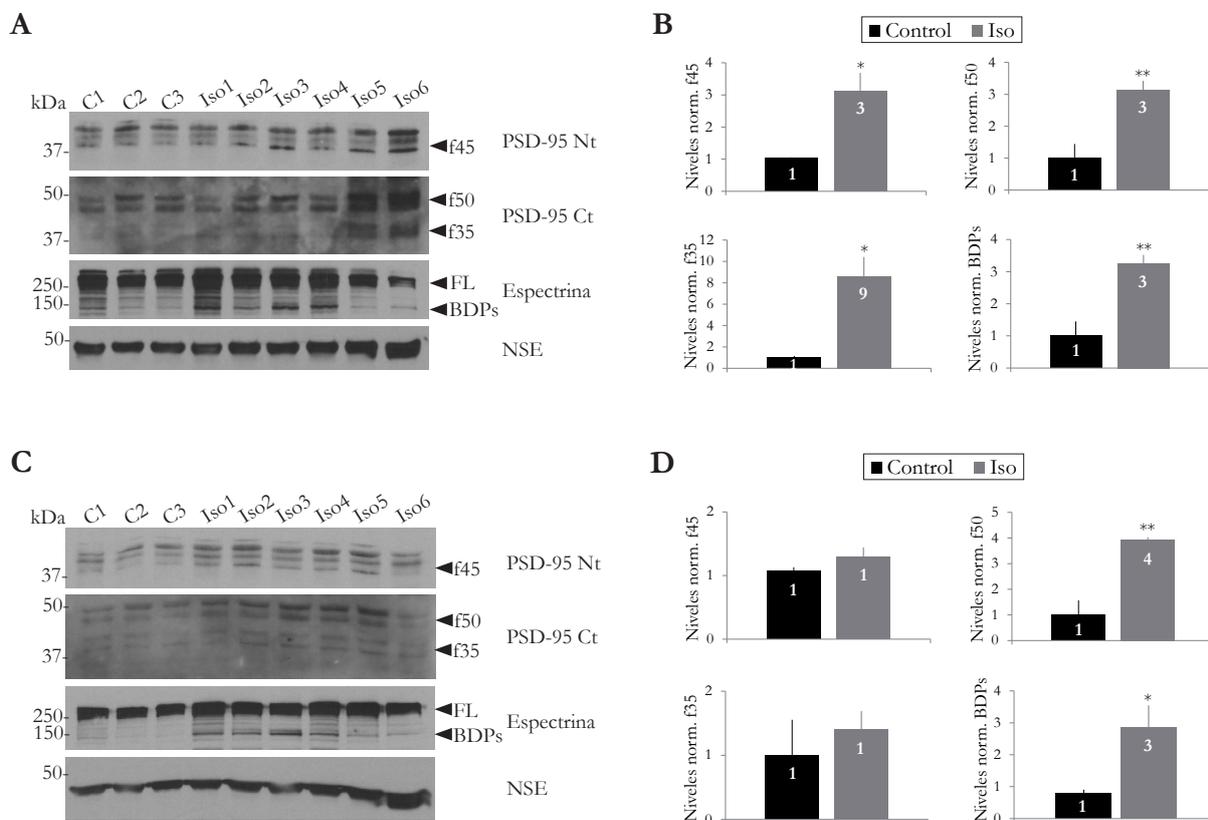


Figura R8. Caracterización de la regulación de PSD-95 en un modelo de daño neuronal moderado inducido por hipoglucemia. A y C. Estudio mediante WB de los niveles de los fragmentos de PSD-95 f45, f50, f35 y de los BDPs de espectrina en la corteza parietal y el estriado, respectivamente, de animales control (C1-C3) o sometidos a coma hipoglucémico durante distintos tiempos (Iso1 e Iso2, 7 min; Iso3 e Iso4, 9 min; Iso5 e Iso6, 12 min). **B y D.** Cuantificación de las bandas correspondientes a f45, f50, f35 y BDPs de espectrina, normalizadas respecto a los niveles de la proteína NSE en la corteza parietal y el estriado, respectivamente. Los resultados aparecen representados en relación al valor medio obtenido en los individuos control, a los que arbitrariamente se asignó el valor 1. Los valores representados son las medias \pm s.e.m. de los animales control y aquellos sometidos a coma durante los distintos tiempos. El análisis estadístico se realizó mediante el test de la *t* de Student desapareada (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n = 3-6$).

Los resultados anteriores sugieren que, en este modelo de daño neuronal moderado, la excitotoxicidad y la consecuente activación de la calpaína en las neuronas susceptibles de corteza parietal y estriado inducen un procesamiento parcial de PSD-95, detectándose fragmentos similares a los anteriormente observados en isquemia cerebral. Además, dicho procesamiento parece correlacionarse con el nivel de daño neuronal.

6. Diseño de péptidos destinados a la interferencia del procesamiento de PSD-95 por calpaína inducido en condiciones de excitotoxicidad

Aunque existen datos contradictorios al respecto (Hou et al., 2005; Zhang et al., 2014b), en este trabajo nos planteamos si PSD-95 podría ejercer un papel neuroprotector limitando de algún modo la susceptibilidad de las neuronas a la excitotoxicidad. En ese caso, su procesamiento por calpaína en situaciones patológicas, como la isquemia cerebral (Gascon et al., 2008b; **Figs. R6 y R7**) o la hipoglucemia (**Fig. R8**), retroalimentaría el proceso de excitotoxicidad. Por ello, quisimos estudiar el efecto de la interferencia del

procesamiento por calpaína de PSD-95 sobre la viabilidad neuronal y elucidar si la estabilización de dicha proteína podría constituir una diana de neuroprotección. Una estrategia efectiva para otros sustratos de calpaína ha consistido en el desarrollo de CPPs con las secuencias putativas de reconocimiento por la proteasa en el referido sustrato (Du et al., 2010; Yin et al., 2013; Gamir-Morralla et al., 2015). En base a ello, diseñamos tres péptidos conteniendo las secuencias de corte por calpaína en PSD-95 identificadas anteriormente (Vidaurre, 2011) fusionadas al péptido Tat anteriormente descrito, que tiene propiedades de CPP (Schwarze et al., 1999). Los péptidos TP9₂₉, TP95₂₅₉ y TP95₄₁₄ contenían respectivamente los aa. 29-42, 259-284 y 414-427 de la secuencia de PSD-95 de rata (**Fig. R9A**). Adicionalmente, como control negativo se sintetizó un péptido de tamaño similar conteniendo la secuencia Tat unida a los aa. 408-421 del FT c-Myc (TMyc) (Tashev et al., 2009; Chiodi et al., 2014).

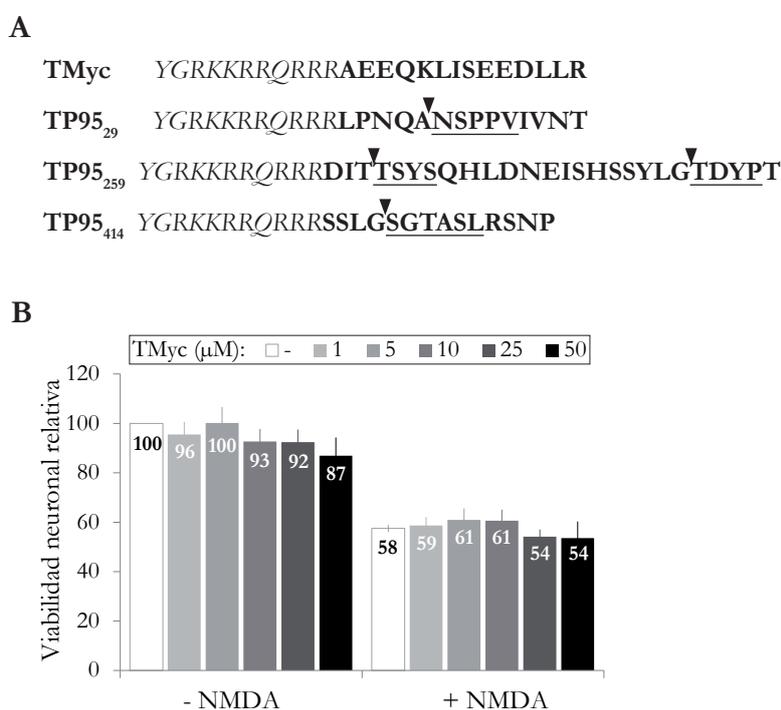


Figura R9. Esquema de los péptidos TMyc y TP95 diseñados y caracterización del péptido control TMyc. A. Secuencia de los péptidos TMyc, TP95₂₉, TP95₂₅₉ y TP95₄₁₄ en la que se indican las secuencias utilizadas de la proteína Tat (aa. 47-57; cursiva), c-Myc (aa. 408-421) y PSD-95 (negrita). Para los péptidos TP95, que contienen respectivamente los aa. 29-42, 259-284 y 414-427, se señalan las secuencias identificadas mediante la técnica de degradación de Edman (subrayado) y el punto de corte por calpaína deducido a partir de ellas (puntas de flecha). **B.** Análisis mediante ensayo MTT del efecto del péptido TMyc sobre la viabilidad neuronal en cultivos celulares control o incubados con TMyc (1, 5, 10, 25 y 50 μM) durante 1 h, y posteriormente sometidos al tratamiento con NMDA (20 μM, 4 h) o sin tratar. El estudio estadístico mediante análisis de la varianza (ANOVA) no mostró diferencias significativas entre los cultivos tratados con TMyc y aquellos que no habían sido incubados con péptido, tanto en ausencia como en presencia de NMDA (n=3).

En primer lugar, comprobamos la idoneidad de TMyc como péptido control en nuestro sistema celular, evaluando su efecto sobre la viabilidad neuronal en condiciones basales y excitotóxicas. Los cultivos primarios neuronales fueron incubados con diferentes concentraciones de TMyc (1, 5, 10, 25 y 50 μM) durante 1 h seguido por el tratamiento con NMDA durante 4 h, o bien mantenidos solo con el péptido durante este tiempo (**Fig. R9B**). Respecto a los cultivos no tratados con TMyc, observamos un comportamiento similar a todas las concentraciones de péptido utilizadas, tanto en condiciones basales como excitotóxicas.

Seguidamente, analizamos de manera preliminar la capacidad de los péptidos TP9₂₉, TP95₂₅₉ y TP95₄₁₄ para prevenir el procesamiento de PSD-95 inducido por NMDA y su efecto sobre la viabilidad neuronal,

utilizando un modelo agudo de excitotoxicidad (**Fig. R10A**). Los cultivos fueron preincubados durante 1 h con TMyc o los distintos péptidos a concentración 25 μM , establecida como óptima para otros péptidos

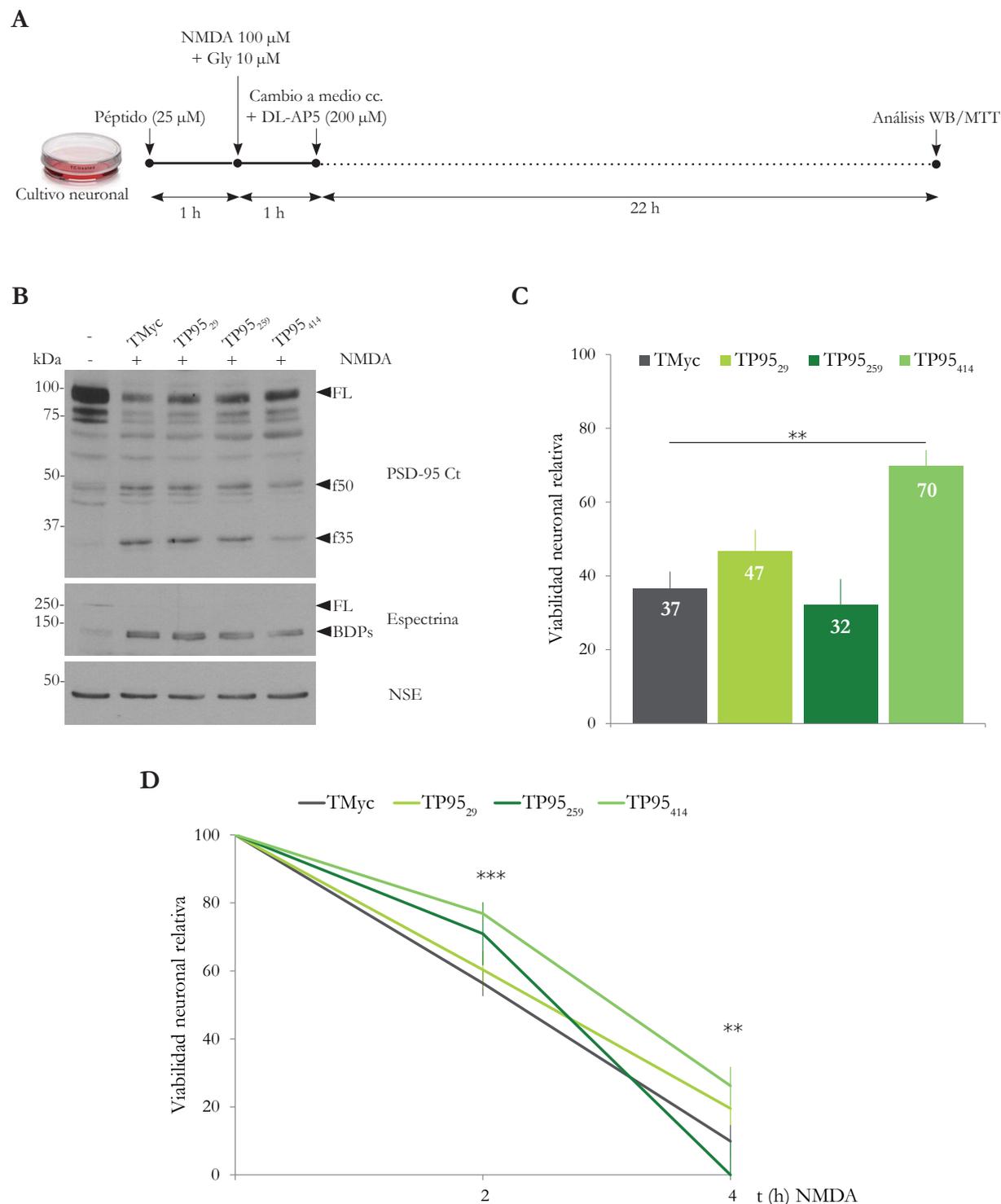


Figura R10. Caracterización del efecto de los péptidos TP95 sobre la regulación de PSD-95 y la viabilidad neuronal en condiciones excitotóxicas. **A.** Esquema del modelo agudo de excitotoxicidad neuronal *in vitro*. Los cultivos primarios neuronales se incubaron con los péptidos TMyc, TP95₂₉, TP95₂₅₉ y TP95₄₁₄ (25 μM) durante 1 h previa al tratamiento con los agonistas del NMDAR (NMDA 100 μM y Gly 10 μM) durante 1 h adicional. Transcurrido este tiempo, este medio fue sustituido por medio condicionado (m.c.) suplementado con el antagonista del NMDAR DL-AP5 (200 μM). Los resultados se analizaron 22 h después mediante WB (**B**) o el ensayo de la viabilidad neuronal con MTT (**C**), donde se compararon con los obtenidos en cultivos control no estimulados a los que arbitrariamente asignamos un valor del 100% ($n=6$). El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) (** $p<0.01$). **D.** Análisis del efecto de los péptidos TP95 sobre la viabilidad neuronal en el modelo de excitotoxicidad crónica. Los cultivos primarios fueron preincubados durante 1 h con el péptido control o los péptidos TP95 (25 μM) y posteriormente estimulados con NMDA 50 μM durante 2 ó 4 h. El análisis estadístico de 9 experimentos independientes se realizó mediante el modelo lineal generalizado (** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

desarrollados en nuestro laboratorio, previamente a su tratamiento con NMDA (100 μ M) durante 1 h. Tras ello, se sustituyó este medio por medio libre de agonistas y conteniendo el antagonista genérico del NMDAR, DL-AP5 (200 μ M). De esta forma se limita la sobreactivación del receptor a un corto periodo de tiempo, si bien suficiente para poner en marcha de forma irreversible el proceso de muerte neuronal (Choi et al., 1987). El análisis por WB 24 h después del inicio del experimento sugería que solamente el péptido TP95₄₁₄ era capaz de preservar parcialmente la proteína PSD-95 FL (**Fig. R10B**). Por otra parte, el análisis de la viabilidad neuronal relativa en cultivos tratados como anteriormente respecto a aquellos no tratados con NMDA ni péptido, a los que se asignó un valor del 100%, solo mostró un aumento significativo en los cultivos pretratados con TP95₄₁₄ ($70\pm 4\%$; $**p < 0.01$) respecto a los incubados con TP9₂₉ y TP95₂₅₉, que alcanzaban valores muy similares a los de TMyc ($47\pm 6\%$ y $32\pm 7\%$, respectivamente, frente a $37\pm 5\%$ con TMyc) (**Fig. R10C**).

A continuación, estudiamos de nuevo el efecto de los péptidos TP95 sobre la supervivencia neuronal pero en cultivos sometidos a un daño excitotóxico crónico mediante tratamiento continuado con NMDA durante 2 y 4 h, posterior a su preincubación durante 1 h con TMyc, TP9₂₉, TP95₂₅₉ y TP95₄₁₄ (25 μ M) (**Fig. R10D**). De nuevo, los cultivos pretratados con TP95₄₁₄ presentaron una viabilidad neuronal significativamente mayor respecto a aquellos incubados con el péptido control a los dos tiempos analizados. Así, la viabilidad en presencia de TP95₄₁₄ solo disminuyó al $77\pm 2\%$ ($***p < 0.001$) y $26\pm 6\%$ ($**p < 0.01$) respectivamente a las 2 y 4 h de tratamiento con NMDA respecto a las células sin tratar, mientras que estos valores alcanzaron el $56\pm 4\%$ y $10\pm 5\%$ en los cultivos pretratados con TMyc. En el caso de TP9₂₉ y TP95₂₅₉, no se observaron diferencias significativas respecto a TMyc, resultado que se correlaciona con su falta de eficacia para prevenir el procesamiento de PSD-95 por calpaína (**Fig. R10B**).

En conjunto, los datos anteriores demuestran que sólo el péptido TP95₄₁₄ tiene un efecto neuroprotector sostenido y significativo sobre la excitotoxicidad inducida por tratamiento crónico o agudo con NMDA, que se corresponde con su capacidad para interferir el procesamiento de la proteína PSD-95.

6.1. Caracterización del efecto neuroprotector del péptido TP95₄₁₄ en el modelo celular de excitotoxicidad en relación a la dosis y duración del tratamiento

Una vez descartado el efecto neuroprotector de los péptidos TP9₂₉ y TP95₂₅₉, quisimos profundizar en la caracterización del péptido TP95₄₁₄. En primer lugar, investigamos el efecto del tratamiento con diferentes dosis de TP95₄₁₄ sobre la estabilidad de PSD-95 y la supervivencia neuronal en condiciones de excitotoxicidad crónica. Los cultivos primarios fueron incubados con distintas concentraciones de TMyc o TP95₄₁₄ (1, 5, 10, 25 y 50 μ M) durante 1 h previamente a su tratamiento con los agonistas del NMDAR durante 4 h (**Fig. R11A**). En presencia de TMyc los niveles de PSD-95 fueron similares a todas las concentraciones de péptido empleadas mientras que TP95₄₁₄ interfirió el procesamiento inducido por NMDA de esta proteína de forma modesta a las concentraciones de 10 μ M y 50 μ M, y de manera más notable a 25 μ M (**Fig. R11A**). El análisis en paralelo de la supervivencia neuronal reflejó que sólo las concentraciones de TP95₄₁₄ de 25 y 50 μ M reducían la muerte neuronal de manera estadísticamente significativa respecto a los cultivos incubados con el péptido control (**Fig. R11B**). Así, la viabilidad con TP95₄₁₄ 25 μ M era del $43\pm 5\%$ respecto al $27\pm 4\%$ observado con TMyc a esa misma concentración ($*p < 0.05$) y, a 50 μ M, alcanzaba el $48\pm 6\%$ respecto al

27±3% de TMyc (** p <0.01; n =6). No existiendo diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad de los cultivos tratados con TP95₄₁₄ a 25 y 50 μ M, y dado que la interferencia máxima del procesamiento de PSD-95 se obtuvo para la concentración de 25 μ M, decidimos establecer ésta como la dosis óptima de uso en el modelo celular de excitotoxicidad.

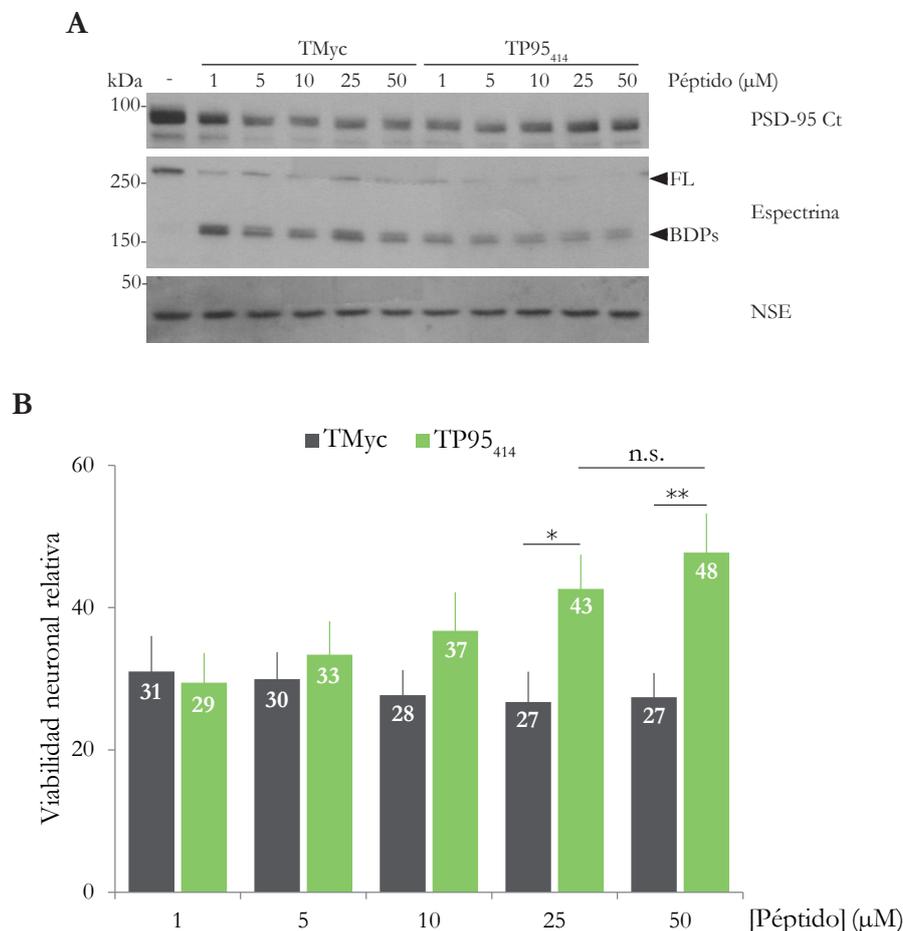


Figura R11. Análisis del efecto de la dosis de TP95₄₁₄ sobre el procesamiento de PSD-95 y la muerte neuronal inducida por excitotoxicidad. **A.** Análisis mediante WB de los niveles de PSD-95 en cultivos primarios preincubados durante 1 h con diferentes concentraciones de TMyc o TP95₄₁₄ (1, 5, 10, 25 y 50 μ M), tratados a continuación con NMDA (50 μ M, 4 h), en comparación con un cultivo control mantenido en condiciones basales. **B.** Viabilidad neuronal de cultivos tratados como anteriormente. Los resultados aparecen representados como porcentaje en relación a la viabilidad neuronal de los cultivos control, a los que arbitrariamente se asignó un valor del 100%. Los valores representados son las medias \pm s.e.m. de 6 experimentos independientes y el análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA; n.s., no significativo; * p <0.05, ** p <0.01).

Posteriormente, investigamos mediante inmunofluorescencia y WB el efecto de TP95₄₁₄ sobre la morfología neuronal y los niveles de PSD-95 en cultivos sometidos a excitotoxicidad (**Fig. R12**). En los cultivos control, la proteína postsináptica PSD-95 presenta un patrón punteado característico delimitando la superficie neuronal, tanto en cuerpos neuronales como en neuritas (**Fig. R12A, panel a**). El tratamiento con NMDA durante 2 h de los cultivos primarios preincubados con TMyc (25 μ M, 1h) produjo una disminución considerable de los niveles de PSD-95 y la condensación de su señal en las zonas proximales de las proyecciones neuronales (**Fig. R12A, panel b**). Sin embargo, el tratamiento con TP95₄₁₄ fue capaz de mantener un patrón de PSD-95 similar al de las células control, así como mayores niveles de la proteína, de acuerdo con su capacidad para interferir su procesamiento (**Fig. R12A, panel c**). La tinción del ADN con DAPI evidenció la presencia de núcleos contraídos y en proceso de muerte en las células estimuladas con NMDA

(Fig. R12A, paneles e y f, puntas de flecha blancas) en comparación con las células control (Fig. R12A, panel d), si bien se observaba una reducción en la abundancia de los mismos en los cultivos tratados con TP95₄₁₄. El análisis mediante WB de cultivos tratados con TMyC o TP95₄₁₄ como anteriormente y estimulados posteriormente con NMDA durante 2 y 4 h reflejó la capacidad del péptido TP95₄₁₄ para preservar los niveles de la proteína PSD-95 durante una estimulación excitotóxica crónica (Fig. R12B). Tras 4 h de tratamiento, los cultivos preincubados con TP95₄₁₄ mantuvieron mayores niveles de PSD-95 en comparación con aquellos incubados con el péptido control (69±6% con TP95₄₁₄ frente a 48±10% con TMyC, **p*<0.05, n=5; Fig. R12C).

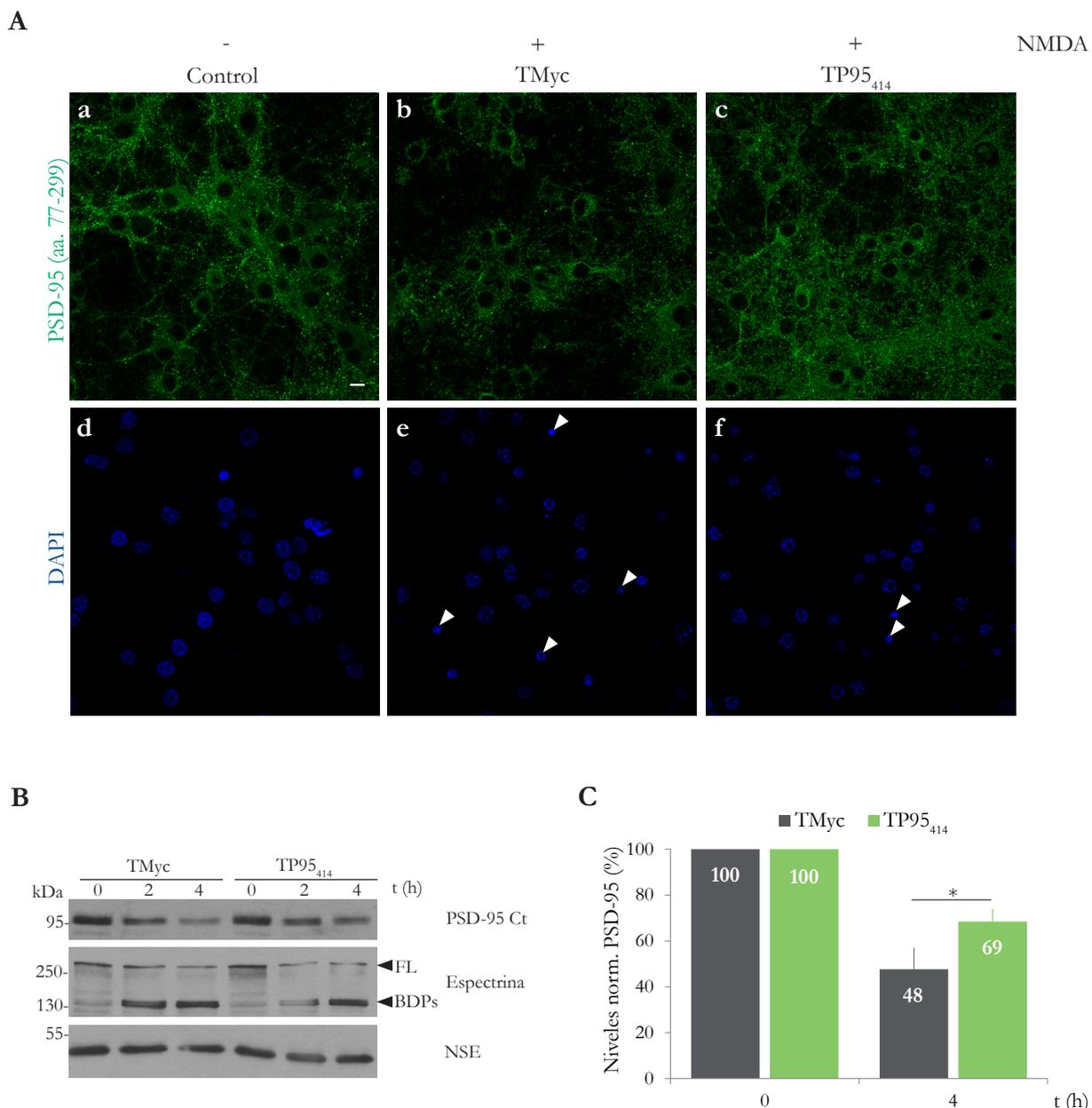


Figura R12. Efecto del péptido TP95₄₁₄ sobre la morfología neuronal y la expresión de PSD-95 en cultivos sometidos a condiciones excitotóxicas. **A.** Análisis mediante inmunofluorescencia del efecto interferente de TP95₄₁₄ en cultivos primarios (13 DIVs) preincubados con los péptidos TMyC o TP95₄₁₄ (25 µM, 1 h) y tratados a continuación con NMDA (50 µM, 2 h). Se señalan núcleos celulares condensados en proceso de muerte (puntas de flecha blancas). Barra de escala: 10 µm. **B.** Estudio mediante WB de los niveles de PSD-95 en cultivos corticales preincubados con los péptidos TMyC o TP95₄₁₄ (25 µM, 1 h) y tratados a continuación con NMDA 50 µM durante 2 ó 4 h. **C.** Cuantificación de los niveles de PSD-95 en ausencia de NMDA o tras 4 h de tratamiento (50 µM), en presencia de TMyC o TP95₄₁₄. El histograma representa los valores medios ± s.e.m. (n=5) respecto a los obtenidos en cultivos tratados con su péptido correspondiente pero sin incubarlo con NMDA, a los que se adjudicó arbitrariamente el valor 100%. El análisis estadístico se realizó mediante el test de la *t* de Student desapareada (**p*<0.05).

Los datos anteriores demuestran que el péptido TP95₄₁₄ tiene un efecto neuroprotector significativo sobre la excitotoxicidad inducida por sobreactivación del NMDAR que es dependiente de la dosis y se corresponde con su capacidad para interferir el procesamiento de PSD-95 por calpaína y las alteraciones morfológicas que preceden a la muerte neuronal.

6.2. Estudio del mecanismo de acción del péptido TP95₄₁₄

Una vez establecido el efecto neuroprotector del péptido TP95₄₁₄ en el modelo celular de excitotoxicidad, quisimos investigar si era debido a una interferencia directa del procesamiento de PSD-95 o un efecto indirecto. La presencia de cinco residuos de serina y una treonina muy próximos al aminoácido 417 procesado por calpaína, igualmente presentes en TP95₄₁₄ (**Fig. R9A**), sugería la posibilidad de que el péptido estuviese modificando el estado de fosforilación de PSD-95 y, con ello, su susceptibilidad al procesamiento, tal como se ha demostrado para otros sustratos de la calpaína (Wu et al., 2007; Rong et al., 2001; Lopez-Menendez et al., 2013).

Como primer abordaje, caracterizamos si el estado de fosforilación en serinas o treoninas afectaba por sí mismo a los niveles de PSD-95, en ausencia de estímulo excitotóxico (**Fig. R13**). Para ello, los cultivos

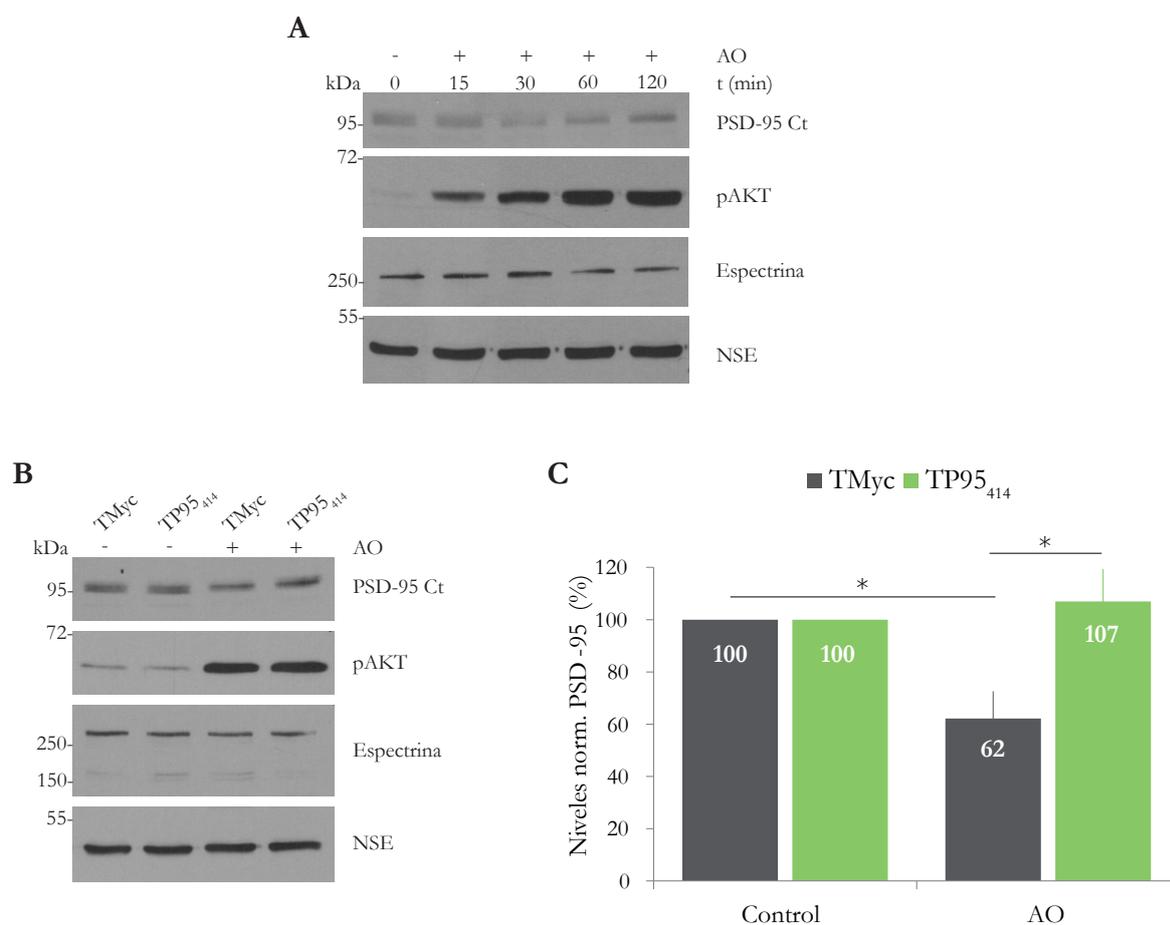


Figura R13. Efecto de la fosforilación en serinas y treoninas sobre la estabilidad basal de PSD-95. A. Análisis por WB del efecto temporal del tratamiento con AO 1 μ M sobre los niveles de PSD-95. Se analizan también los niveles de la proteína AKT fosforilada en su residuo S473 como control del funcionamiento del inhibidor. El WB mostrado es representativo de los resultados obtenidos. **B.** Estudio por WB del efecto del péptido TP95₄₁₄ sobre la estabilidad de PSD-95 en presencia de AO. Los cultivos primarios fueron preincubados con los péptidos TMyc o TP95₄₁₄ (25 μ M) durante 1 h previa al tratamiento con AO (1 μ M) durante 30 min. **C.** Cuantificación de los niveles de PSD-95 en las condiciones anteriores normalizados respecto a la proteína NSE. Los resultados aparecen representados como porcentaje en relación a los niveles de PSD-95 obtenidos en los cultivos tratados con su péptido correspondiente pero no estimulados con AO. Se representan los valores medios \pm s.e.m. de 5 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante el test de la *t* de Student desapareada (* p <0.05).

neuronales fueron incubados durante diferentes tiempos (15 min-2 h) con ácido okadaico (AO) 1 μ M, concentración a la que este compuesto inhibe a las serina/treonina fosfatasa PP1 y PP2A (**Fig. R13A**). A tiempos tempranos (15-30 min), el AO inducía una disminución transitoria de los niveles de PSD-95, que volvían a recuperarse tras 1 y 2 h de tratamiento con el inhibidor. La inhibición de estas fosfatasa por acción del AO quedó patente utilizando un fosfoanticuerpo que reconoce específicamente la proteína AKT fosforilada en su S473, así como por la aparición de un cierto retraso en la migración de la propia PSD-95. Los niveles de espectrina y NSE no presentaron cambios a lo largo del tratamiento, sugiriendo que la regulación de PSD-95 era específica. Posteriormente, analizamos si la disminución de los niveles de PSD-95, detectada a tiempos tempranos de tratamiento con AO, podía revertirse por el tratamiento con TP95₄₁₄. Nuestra hipótesis consistía en que si la fosforilación de alguna/s de las cinco serinas o la treonina presentes en la secuencia de TP95₄₁₄ era crítica para la desestabilización de PSD-95, el péptido competiría dentro de la célula por la unión a las quinasas reguladoras y disminuiría la acumulación de las fosforilaciones desestabilizadoras en la proteína, conservando así PSD-95 en un estado de menor fosforilación y susceptibilidad a la acción de calpaína. Para poner a prueba dicha hipótesis, tratamos los cultivos neuronales durante 1 h con TP95₄₁₄ o TMyC previamente al tratamiento con AO durante 30 min (**Fig. R13B**). Mientras que la inhibición de las fosfatasa producía en presencia de TMyC una disminución significativa en PSD-95, que alcanzaba niveles del $62 \pm 10\%$ respecto a los cultivos tratados solo con este péptido ($*p < 0.05$), la presencia de TP95₄₁₄ revertía significativamente el efecto del AO, manteniéndose niveles de PSD-95 similares a los de las células tratadas solo con péptido ($106 \pm 12\%$, $*p < 0.05$, **Fig. R13C**).

Seguidamente, comenzamos a caracterizar de manera preliminar el efecto del estado de fosforilación de PSD-95 sobre su susceptibilidad al procesamiento por calpaína, tanto en condiciones de excitotoxicidad como en ensayos de digestión *in vitro*. En primer lugar, tratamos los cultivos primarios con AO (1 μ M) durante 30 min previamente al tratamiento con NMDA durante 2 h (**Fig. R14A**). Los cultivos incubados solamente con AO (tiempo total 2 h y 30 min) mantenían niveles de PSD-95 similares a los de los cultivos sin tratar, coincidiendo con las observaciones anteriores (**Fig. R13A**). Sin embargo, la hiperfosforilación de la proteína, manifestada por un retraso en su movilidad electroforética, parecía aumentar su susceptibilidad al procesamiento tras la estimulación excitotóxica. Posteriormente, realizamos ensayos de digestión *in vitro* con calpaína I purificada (50 U/ml; 15-60 min) utilizando extractos proteicos de cultivos neuronales incubados con los péptidos TMyC o TP95₄₁₄ (1 h) previamente al tratamiento con AO (30 min) (**Fig. R14B**). Como anteriormente (**Fig. R13C**), los niveles de partida de la proteína PSD-95 fueron superiores en los cultivos preincubados con TP95₄₁₄ pero, además, la digestión con calpaína parecía ser menos eficiente. Estos resultados sugieren que TP95₄₁₄ podría estar interfiriendo la fosforilación en serinas y/o treoninas en la secuencia 414-427 de PSD-95, fosforilaciones que, caso de ocurrir, aumentarían la susceptibilidad de PSD-95 al procesamiento por calpaína.

En conjunto, los datos anteriores sugieren un importante papel regulador del procesamiento de PSD-95 por calpaína de los residuos serina/treonina presentes en los aa. 414-427, tanto en condiciones basales como excitotóxicas. El péptido TP95₄₁₄ podría estar ejerciendo su efecto neuroprotector a través de la interferencia de la fosforilación de esta secuencia, disminuyendo así la susceptibilidad de PSD-95 a ser procesada por calpaína.

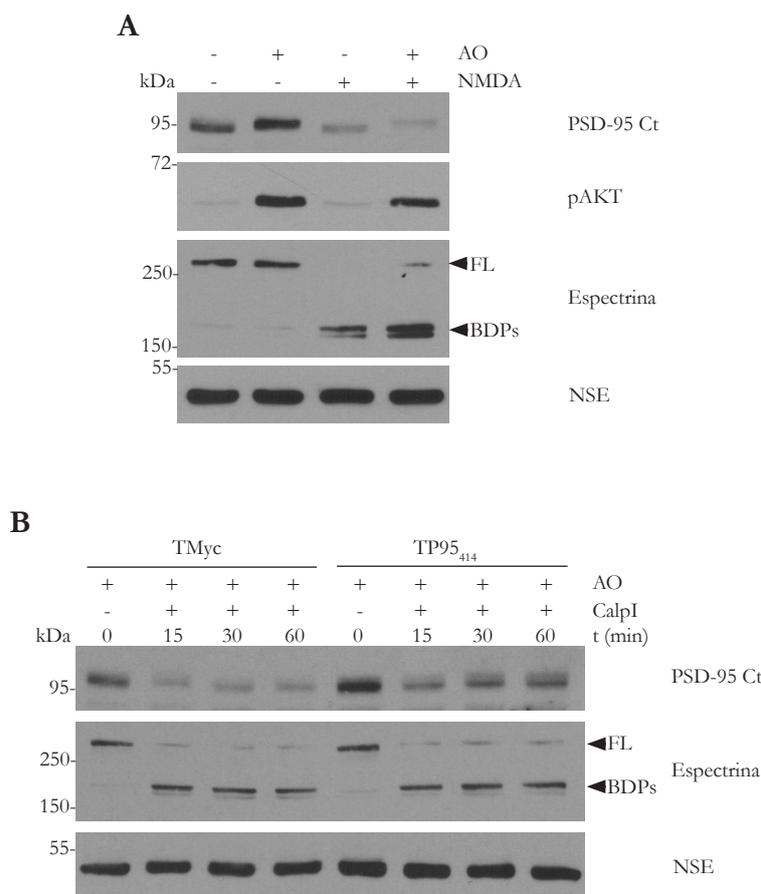


Figura R14. Efecto del estado de fosforilación de PSD-95 en serinas y treoninas sobre su regulación en condiciones de excitotoxicidad. **A.** Análisis por WB del efecto del tratamiento con AO 1 μ M durante 30 min y la posterior estimulación con NMDA 50 μ M durante 2 h sobre los niveles de PSD-95. También se analiza la proteína AKT fosforilada en su residuo S473 como control del funcionamiento del AO. **B.** Estudio de la susceptibilidad de la proteína PSD-95 hiperfosforilada a la digestión *in vitro* con calpaína I purificada. Los cultivos neuronales fueron tratados durante 1 h con los péptidos TMyc o TP95₄₁₄ (25 μ M) previamente a la estimulación con AO (1 μ M) durante 30 min. Los extractos procedentes de estos cultivos fueron digeridos con 50 U/ml de calpaína I durante 15, 30 y 60 min.

7. Evaluación del efecto neuroprotector de TP95₄₁₄ en el modelo de isquemia cerebral permanente

Una vez demostrado el efecto neuroprotector de TP95₄₁₄ *in vitro*, quisimos caracterizar si también tenía propiedades neuroprotectoras *in vivo*. Para ello, utilizamos el modelo de isquemia cerebral permanente en el que habíamos mostrado previamente la regulación de PSD-95 por el daño isquémico (Figs. R6 y R7). Era importante optimizar previamente la estabilidad en el plasma sanguíneo de los péptidos, administrados por vía i.v., cara a preservar su actividad biológica. La modificación de los residuos terminales de los péptidos mediante su acetilación (extremo N-terminal) y amidación (extremo C-terminal) mejora la estabilidad frente a la acción de diversas peptidasas y reduce su degradación (Matsumoto et al., 2009; Stromstedt et al., 2009). Por tanto, diseñamos una versión modificada de TMyc y TP95₄₁₄ según lo anteriormente indicado para obtener MTMyc y MTP95₄₁₄. Antes de ensayar su efecto *in vivo*, comparamos el efecto de los péptidos modificados respecto a los utilizados anteriormente sobre la viabilidad neuronal en condiciones basales (Fig. R15A) o de excitotoxicidad (Fig. R15B). Este análisis confirmó la ausencia de diferencias significativas en la viabilidad neuronal tras la incubación con los distintos péptidos durante 5 h en comparación con cultivos sin tratar (Fig. R15A). Además, comprobamos que el péptido MTP95₄₁₄ conservaba el efecto neuroprotector de TP95₄₁₄ en condiciones excitotóxicas (Fig. R15B). Así, la estimulación con NMDA (50 μ M, 2 h) pro-

dujo una disminución de la viabilidad neuronal que era mayor para los cultivos preincubados con MTMyc (38±5%) que para los tratados con TP95₄₁₄ y MTP95₄₁₄ (70±2%, y 72±7%, respectivamente, ***p*<0.01), similares entre sí y estadísticamente diferentes respecto a MTMyc.

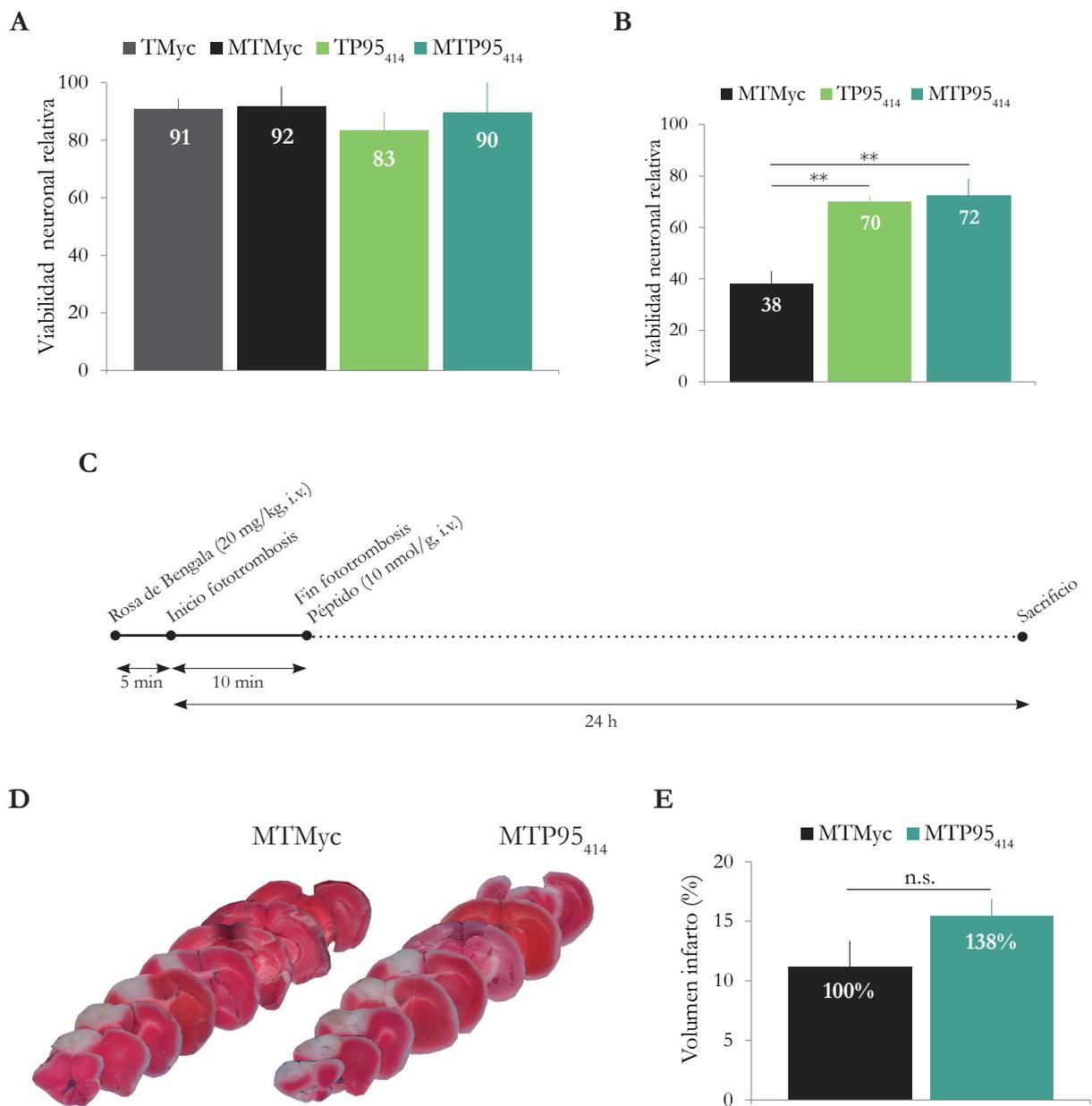


Figura R15. Análisis del posible efecto neuroprotector de MTP95₄₁₄ en un modelo de isquemia cerebral permanente. **A.** Ensayo MTT del efecto de los péptidos TMyc, TP95₄₁₄ y sus variantes modificadas, MTMyc y MTP95₄₁₄, sobre la viabilidad neuronal basal. Los cultivos primarios fueron incubados durante 5 h con los distintos péptidos a la concentración de 25 μ M (n=4-5). Los datos se analizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) no encontrándose diferencias significativas. **B.** Estudio mediante ensayo MTT del efecto protector del péptido MTP95₄₁₄ en condiciones excitotóxicas. Los cultivos fueron pretratados con los péptidos MTMyc, TP95₄₁₄ y MTP95₄₁₄ (25 μ M, 1 h) y posteriormente estimulados con NMDA (50 μ M) durante 2 h (n=3). El estudio estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) (***p*<0.01). **C.** Esquema del protocolo de inducción de isquemia cerebral focal permanente utilizado en paneles D y E. Ratones de 8 semanas fueron inyectados con el agente oxidante Rosa de Bengala (20 mg/kg) y, 5 min después, se irradió la zona de corteza motora escogida (coordenadas +0.2 AP, +2 ML) con un haz de luz fría (\emptyset 1.5 mm, 10 min). Seguidamente, los péptidos MTMyc o MTP95₄₁₄ (10 nmol/g) se administraron por vía i.v. y los animales se sacrificaron a las 24 h del inicio del daño isquémico. **D.** Secciones coronales representativas, teñidas con el colorante vital TTC, de animales sometidos a isquemia y tratados con MTMyc y MTP95₄₁₄ como se indicó. **E.** Evaluación del volumen de infarto. Los datos se expresan en porcentaje respecto al total del hemisferio. Arbitrariamente asignamos un valor del 100% al promedio del volumen de infarto obtenido en los animales tratados con el péptido control MTMyc. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (n.s.) entre los dos grupos de animales utilizando el test de la *t* de Student desapareada (MTMyc, n=5; MTP95₄₁₄, n=3).

Seguidamente estudiamos el efecto de MTP95₄₁₄ *in vivo*, administrando una dosis de 10 nmol/g de los péptidos MTMyc y MTP95₄₁₄ por vía i.v. a través del seno retro-orbital 10 min después del inicio del daño isquémico (**Fig. R15C**). Este esquema de administración, de relevancia clínica, tendría la ventaja de que la entrada de los péptidos en las neuronas estaría facilitada por la activación de los procesos de endocitosis asociados a la excitotoxicidad (Vaslin et al., 2009) y por la apertura de la BHE producida de forma temprana (**Fig. R6B**). Sin embargo, la rapidez de la oclusión microvascular inducida por la fototrombosis dificultaría el acceso de los péptidos a la región cerebral infartada, que tendría que ocurrir por flujo colateral. Analizamos el volumen relativo de la región infartada en animales sacrificados 24 h después de la inducción del daño, visualizado mediante tinción de las rodajas coronales con TTC (**Fig. R15D**). Los resultados no mostraron diferencias significativas entre los grupos tratados con MTMyc o MTP95₄₁₄ (**Fig. R15E**; n=6) lo que permite concluir que, en las condiciones experimentales empleadas, el péptido MTP95₄₁₄ no tiene efecto neuroprotector.

8. Caracterización del procesamiento de GluN2A en el modelo de excitotoxicidad *in vitro*

El trabajo anterior de nuestro laboratorio permitió establecer que la sobreactivación del NMDAR daba lugar al procesamiento mediado por calpaína de las subunidades GluN2A en su región C-terminal intracelular y a la formación de subunidades truncadas estables (115 kDa, f115) que contenían el extremo N-terminal y permanecían en la membrana plasmática (Gascon et al., 2008b). Sin embargo, a diferencia de PSD-95, desconocíamos las secuencias exactas de procesamiento, una información importante para el diseño de péptidos neuroprotectores. Experimentos preliminares con anticuerpos específicos de las secuencias C-terminales de GluN2A ya habían revelado la dificultad para detectar en neuronas el/los fragmento/s C-terminal/es (fCt) resultantes de su procesamiento por calpaína (**Fig. R2A**). Para avanzar en esta caracterización decidimos realizar, en primer lugar, un ensayo de digestión *in vitro* con calpaína I purificada (25, 50 y 100 U/ml, 30 min) en extractos proteicos de cultivos neuronales (**Fig. R16A**). Nuestro grupo ha demostrado previamente que en este tipo de ensayo es posible detectar fragmentos de muy baja estabilidad en cultivos primarios sometidos a excitotoxicidad (Gamir-Morralla et al., 2015). Además de confirmar que GluN2A es sustrato de calpaína, este experimento mostró que el procesamiento de esta subunidad produce más de 6 fragmentos C-terminales de tamaños comprendidos entre 74 y 15 kDa, siendo muy pequeños los niveles de los de menor tamaño molecular. Analizamos también el procesamiento de GluN2A en cultivos neuronales en los que se indujo el proceso de excitotoxicidad con NMDA 20 μ M durante 2, 4 y 6 h (**Fig. R16B**). Los niveles de GluN2A FL disminuyeron de forma rápida, proceso acompañado por la aparición de fragmentos C-terminales similares a los obtenidos mediante digestión *in vitro*. Como anteriormente, la escasa acumulación de estos fragmentos no se correspondía con la desaparición de la proteína GluN2A FL, confirmando la baja estabilidad celular de los fCt. Sin embargo, experimentos similares con un anticuerpo que reconoce la región N-terminal de GluN2A y GluN2B demostró la formación de f115, cuyos valores normalizados relativos se incrementaron significativamente desde sus niveles basales ($9\pm 4\%$) hasta alcanzar un máximo a las 4 h, valor al que arbitrariamente adjudicamos el 100% (**Fig. R16C**). Solo posteriormente, los niveles de f115 comenzaban a disminuir moderadamente, revelando su elevada estabilidad en condiciones

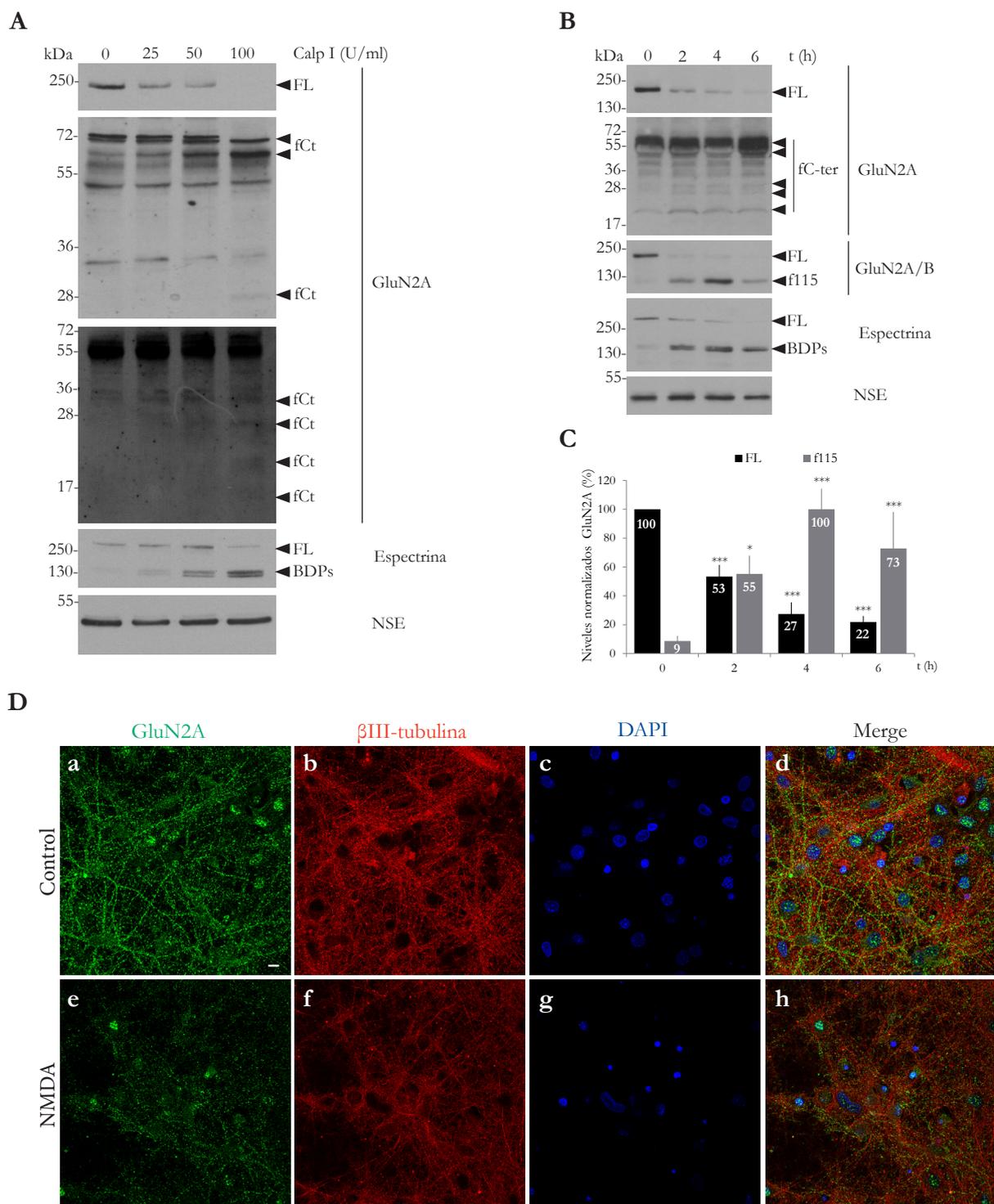


Figura R16. Caracterización del procesamiento de GluN2A por calpaína. **A.** Análisis de la susceptibilidad de GluN2A a la digestión *in vitro* con calpaína. Extractos de cultivos neuronales (14 DIVs) fueron digeridos con calpaína I purificada (25, 50 y 100 U/ml) durante 30 min y analizados mediante WB. Se utilizaron geles desnaturalizantes convencionales con diferente concentración de acrilamida (8% en primer y segundo panel y 15% en tercer panel). La sobreexposición de las membranas mostró la aparición de fragmentos C-terminales de GluN2A fruto de su procesamiento (fCt). **B.** Estudio mediante WB del efecto del tratamiento con NMDA 20 μ M durante 2, 4 y 6 h sobre los niveles de GluN2A en cultivos primarios de 13 DIVs. Para el análisis de los fCt de menor tamaño molecular, los lisados celulares se resolvieron en un gel Bis-Tris. **C.** Cuantificación por densitometría de los niveles de GluN2A-FL y f115, normalizados respecto a los de NSE. Los resultados aparecen representados como porcentaje en relación al valor máximo obtenido, al que se asignó arbitrariamente un 100% (cultivos sin estimular para GluN2A-FL, 4 h de tratamiento para f115). Se representan las medias \pm s.e.m. de 3-6 experimentos independientes y el análisis estadístico se realizó mediante el modelo lineal generalizado ($*p < 0.05$, $***p < 0.001$). **D.** Doble inmunofluorescencia de cultivos neuronales (13 DIVs) sin tratar o estimulados con NMDA 20 μ M durante 4 h para GluN2A (verde, paneles a y e) y β III-tubulina (rojo, paneles b y f). También se visualizan los núcleos mediante tinción con DAPI (azul, paneles c y g). Las imágenes son secciones individuales obtenidas mediante microscopía confocal en las que se muestran los canales por separado o fusionados (paneles d y h). Barra de escala: 10 μ m.

excitotóxicas, particularmente en comparación con los fCt. Los niveles normalizados de FL disminuyeron de manera progresiva, alcanzando valores del $53\pm 8\%$ ($***p<0.001$), $27\pm 8\%$ ($***p<0.001$) y $22\pm 4\%$ ($***p<0.001$) respectivamente a las 2, 4 y 6 h respecto a las células sin tratar ($n=5-6$). Seguidamente analizamos mediante inmunofluorescencia la distribución de GluN2A en las neuronas en condiciones basales y los cambios ocasionados por la excitotoxicidad (**Fig. R16D**). Los cultivos control mostraron un patrón de GluN2A punteado, preferentemente delimitando la superficie neuronal, tanto en somas como en neuritas (**paneles a y d**). El tratamiento con NMDA ($20\ \mu\text{M}$, 4 h) confirmó una pérdida generalizada de la señal de GluN2A (**paneles e y h**) y la aparición de núcleos retraídos y en proceso de muerte, a diferencia de lo observado en las células sin estimular (**paneles g y c**, respectivamente). La cotinción con un anticuerpo específico para la proteína neuronal β III-tubulina no mostró diferencias importantes en los niveles de esta proteína, tan sólo una redistribución parcial en las células tratadas con NMDA como consecuencia de las alteraciones morfológicas debidas al proceso excitotóxico (**paneles b y f**).

En conjunto, estos datos demuestran que el procesamiento de GluN2A por calpaína inducido en condiciones de excitotoxicidad *in vitro* es complejo y tiene lugar en múltiples secuencias de su región intracelular, formándose fragmentos C-terminales que son solo transitoriamente estables, a diferencia de la forma trunca de esta subunidad que contiene su extremo N-terminal.

9. Caracterización del procesamiento de GluN2A en el modelo de isquemia permanente

Anteriormente nuestro laboratorio demostró la regulación *in vivo* de las subunidades GluN2 en procesos de isquemia transitoria (Gascon et al., 2008b) que, similarmente al modelo *in vitro*, daban lugar a la formación temprana de subunidades GluN2A y GluN2B truncadas (f115), estables durante al menos 48 h tras la reperusión del tejido. En esos experimentos tampoco fue posible detectar los fCts de las subunidades. Como en el caso de PSD-95, cara a establecer las condiciones más apropiadas para analizar *in vivo* los péptidos neuroprotectores que proyectábamos desarrollar para GluN2A, previamente era necesario caracterizar su cinética de regulación en el modelo de isquemia permanente elegido. En animales sacrificados a diferentes tiempos tras la inducción del daño cerebral (2.5, 5 ó 24 h), comparamos el tejido isquémico aislado del hemisferio ipsilateral (I) y la región cortical equivalente en el hemisferio contralateral (C) (**Fig. R17A**). Como control adicional utilizamos de nuevo animales *sham-operated*. Pudimos establecer un procesamiento muy temprano de ambas subunidades GluN2 y la rápida acumulación de f115 que, por ejemplo, pasó de niveles prácticamente indetectables en los animales *sham-operated* a alcanzar su máximo a las 5 h de daño (**Fig. R17C**). Estos resultados revelan además una elevada estabilidad de este fragmento también en este modelo de isquemia. Con el anticuerpo específico de su región C-terminal, también observamos una disminución muy rápida de GluN2A-FL en el tejido ipsilateral que era estadísticamente significativa desde tiempos muy tempranos de daño (**Fig. R17B**). Así por ejemplo, ya a las 2.5 h, GluN2A-FL alcanzaba en el tejido isquémico valores del $11\pm 4\%$ respecto a su correspondiente región contralateral ($***p<0.001$; $n=4$). De manera paralela, detectamos la formación de varios fCts de tamaños similares a los observados en el modelo celular de excitotoxicidad (**Fig. R16B**) y en las digestiones con calpaína purificada (**Fig. R16A**). Sus niveles fueron máximos a las 2.5 h de daño, decayendo de manera muy rápida a continuación. Como anteriormente, la

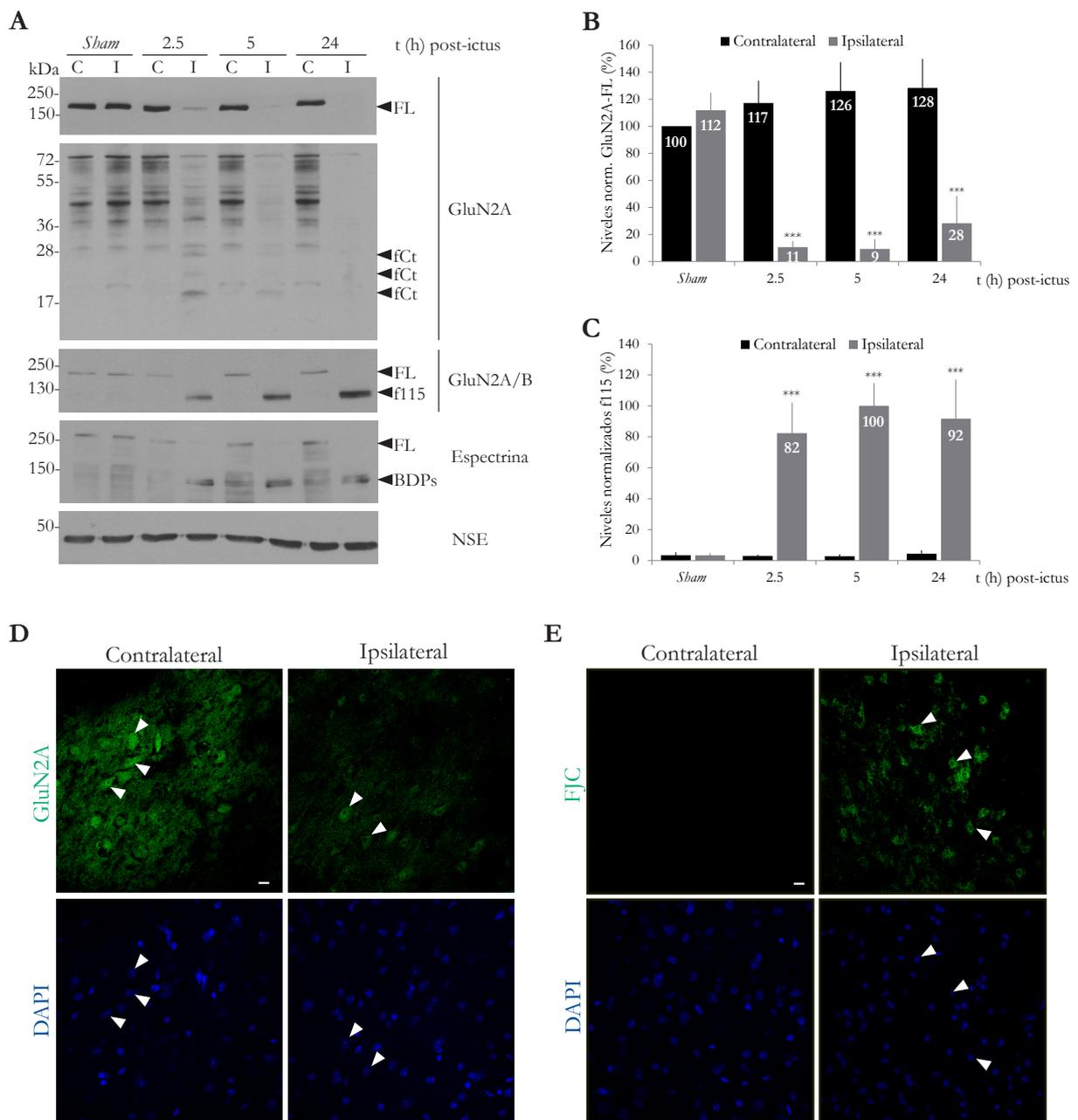


Figura R17. Regulación de GluN2A en el modelo de isquemia cerebral permanente. **A.** Análisis mediante WB de GluN2A en extractos de cerebro de ratones sometidos a isquemia cerebral permanente, sacrificados 2.5, 5 ó 24 h después del daño, comparados con ratones *sham-operated*. Se analizan las regiones infartadas del hemisferio ipsilateral (I) y las áreas equivalentes en el hemisferio contralateral (C). La sobreexposición de la mitad inferior del WB de GluN2A mostró la aparición de fragmentos C-terminales fruto de su procesamiento (fCt) resueltos en un gel Bis-Tris. **B** y **C.** Cuantificación por densitometría de los niveles de GluN2A-FL y f115, respectivamente, en los animales anteriores (n=4). Los valores fueron normalizados respecto a NSE y se representan como valores relativos respecto al valor medio obtenido en el hemisferio contralateral de los animales *sham-operated* (GluN2A-FL) o al valor máximo obtenido en el hemisferio ipsilateral a las 5 h (f115). El análisis estadístico se realizó mediante el modelo lineal generalizado (***) $p < 0.001$. **D** y **E.** Análisis mediante IHQ de la regulación de GluN2A concomitante al proceso de neurodegeneración. Secciones coronales (30 μ m) de cerebro de ratón sometido a isquemia cerebral permanente y sacrificado 5 h después del inicio de la lesión. Se muestran imágenes de microscopía confocal representativas de las tinciones obtenidas en la región isquémica y el área equivalente en el hemisferio contralateral en secciones consecutivas. Se señalan células con señal específica para GluN2A (**D**) o marcadas con FJC (**E**) y sus respectivos núcleos (puntas de flecha blancas). La regulación negativa de GluN2A en el hemisferio ipsilateral se correlaciona con la condensación nuclear y el marcaje de neuronas en proceso de muerte. Barra de escala: 10 μ m.

activación de la calpaína ocurrió de manera temprana tras la inducción del daño. Los resultados anteriores fueron confirmados mediante inmunohistoquímica de secciones coronales consecutivas de cerebro de animales sacrificados 5 h tras la inducción del daño. En ellas observamos un notable descenso en los niveles de

subunidad tras la isquemia (**Fig. R17D**) paralelo a la tinción de las neuronas del área isquémica en secciones contiguas con FJC, marcador específico del proceso de neurodegeneración (**Fig. R17E**).

Los resultados anteriores nos permiten concluir que en el modelo de isquemia permanente las subunidades GluN2 del NMDAR sufren un rápido y eficiente procesamiento, que lleva a la práctica desaparición de las subunidades a las 2.5 h de daño. Este procesamiento conduce a la formación y acumulación en el tejido isquémico de grandes fragmentos N-terminales de las subunidades (f115), muy estables incluso en fases muy avanzadas de la lesión, y fragmentos C-terminales de GluN2A muy poco estables.

10. Efecto de la mutación de los aa. 942-944 y 1184-1187 de GluN2A sobre su sensibilidad al procesamiento por calpaína

Previamente a conocer la complejidad del procesamiento de GluN2A en isquemia, y con objeto de profundizar en el efecto que la degradación por calpaína tenía sobre la funcionalidad de los NMDARs, nos propusimos generar mutantes de GluN2A en sitios putativos de procesamiento por esta proteasa (González-Camacho, 2012). Para ello, utilizamos las predicciones realizadas por Bi y colaboradores (1998b) combinando datos experimentales con el resultado de comparar las secuencias de las subunidades GluN2 con aquellas reconocidas por calpaína en una serie de sustratos establecidos. La eficacia de este tipo de predicciones es solo relativa, dado que la proteasa no reconoce en sus sustratos secuencias aminoacídicas altamente conservadas sino elementos estructurales de orden superior (Tompa et al., 2004; Stabach et al., 1997). Sin embargo, dos de las predicciones, correspondientes a regiones intracelulares próximas al cuarto segmento transmembrana (aa. 868-869 y 943-944), concordaban muy bien con nuestros resultados mostrando la formación de f115 en excitotoxicidad *in vitro* y en isquemia transitoria (Gascon et al., 2008b). El trabajo de Bi y colaboradores (1998b) también proponía una tercera secuencia de procesamiento entre los aa. 1187-1188 de GluN2A. En base a ello, se realizó mutagénesis dirigida sobre la secuencia del ADNc del GluN2A de rata, sustituyendo secuencias de 3-4 aminoácidos en torno a las posiciones indicadas por alaninas o valinas (**Fig. R18A, cajas**), que generarían subunidades mutantes a los que denominamos GluN2A-M1, GluN2A-M2, GluN2A-M3 y GluN2A-M2/3. Utilizamos vectores lentivirales desarrollados por nuestro grupo (Gascon et al., 2008a) con el objetivo de expresar de forma neuroespecífica las subunidades mutadas en los cultivos primarios, analizando seguidamente su efecto en la susceptibilidad de GluN2A al procesamiento por calpaína (González-Camacho, 2012). Los resultados mostraron que los mutantes GluN2A-M2 y GluN2A-M3 eran menos sensibles, mientras que la estabilidad de GluN2A-M1 era similar a la de la proteína *wild type*. El efecto de la doble mutación en GluN2A-M2/3 fue mayor que el de las mutaciones individuales. En esta Tesis, confirmamos los resultados anteriores mediante ensayos de digestión *in vitro* con calpaína I purificada en extractos proteicos de células HEK293T transfectadas con los vectores lentivirales anteriores (**Fig. R18B**). El análisis con un anticuerpo específico para la secuencia de hemaglutinina (HA) insertada en el extremo N-terminal de estas proteínas confirmó que GluN2A-M2, y de manera más clara GluN2A-M3 y GluN2A-M2/3, presentaban una sensibilidad menor al procesamiento. Resultados similares se obtuvieron con el anticuerpo que reconoce la secuencia N-terminal de GluN2A y GluN2B. En general, también se detectó una menor producción de f115 y de fCts para las subunidades mutantes respecto a la proteína *wild type*. La activación de la calpaína y la especificidad del procesamiento se confirmaron como habitualmente mediante

A

Segmento transmembrana IV

```

781 QFVGDGEMEE LETLWLTGIC HNEKNEVMSS QLDIDNMAGV FYMLAAAMAL SLITFIWEHL
841 FYWKLRFCTFT GVCSDRPGLL FSISRGIYSC IHGVHIEEKK KSPDFNLTGS QSNMLKLLRS
      M1 AAA
901 AKNISNMSNM NSSRMDSPKR ATDFIQRGS L IYSDNRSFQ GKDSIFGDNM
      M2 AAA
961 NELQTFVANR HKDNLSNYVF QGQHPLTLNE SNPNTVEVAV STESKGNRSP RQLWKKSMES
1021 LRQDSLQNP VSQRDEKTAE NRTHSLKSPR YLPEEVAHSD ISETSSRATC HREPNNKNH
1081 KTKDNFKRSM ASKYPKDCSD VDRTYMKTKA SSPRKIYTI DGEKEPSFHL DPPQFVENIT
1141 LPENVGF PDT YQDHNFNFRK GDSTLPMNRN PLHNEDGLPN NDQYKLYAKH FTLKDKGSPH
      M3 VAAA
1201 SEGSDRYRQN STHCRSCLSN LPTYSGHFTM RSPFKCDA CL RMGNLYDIDE DQMLQETGNP
1261 ATREEVYQQD WSQNNALQFQ KNKLRINRQH SYDNILDKPR EIDLSRPSRS ISLKDRERLL
1321 EGNLYGSLFS VPSSKLLGNK SSLFPQGLD SKRSKSLLPD HASDNPFLHT YGDDQRLVIG
1381 RCPSPYPKHS LPSQAVNDSY LRSSLRSTAS YCSRDSRGHS DVYISEHVMP YAANKNTMYS
1441 TPRVLNSCSN RRVYKKMPSI ESDV
    
```

B

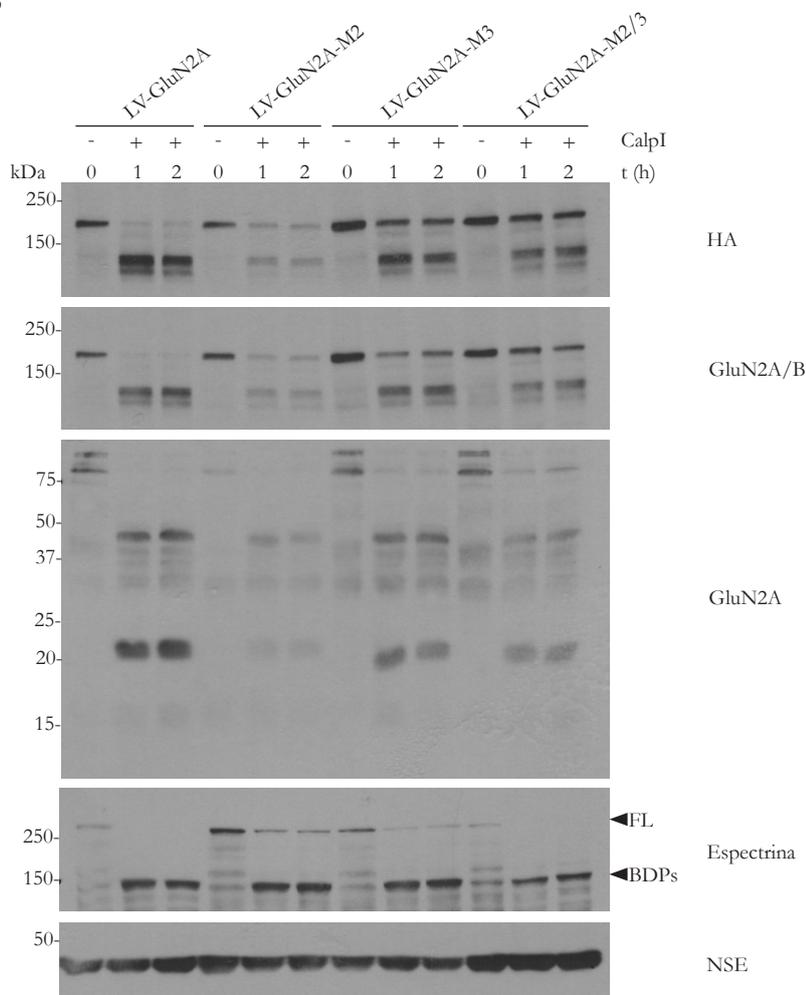


Figura R18. Análisis de la susceptibilidad al procesamiento por calpaína de formas mutadas de GluN2A en los aa. 942-944 y 1184-1187. A. Dominio C-terminal de GluN2A (aa. 781-1464) en el que se encuentra la secuencia correspondiente al segmento transmembrana IV (rojo), los sitios putativos de procesamiento por calpaína mutagenizados (cajas de puntos discontinuos) para generar respectivamente: GluN2A-M1, aa. 867-869; GluN2A-M2, aa. 942-944 y GluN2A-M3, aa. 1184-1187, así como el punto de corte por calpaína en la secuencia aminoacídica (puntas de flecha). Los aminoácidos mutagenizados se muestran en azul y los aminoácidos que los sustituyeron en verde. **B.** Digestión *in vitro* con calpaína I purificada de extractos proteicos procedentes de cultivos de células HEK293T transfectadas con los vectores lentivirales que expresan los ADNc codificantes para la subunidad GluN2A salvaje o las formas mutadas (LV-GluN2A-M2, LV-GluN2A-M3 y el mutante doble LV-GluN2A-M2/3). Los extractos digeridos con 100 U/ml de calpaína I purificada durante 1 y 2 h fueron analizados seguidamente por WB.

la inmunodetección respectivamente de espectrina y NSE, proteínas expresadas en esta línea celular.

Los resultados anteriores sugieren que los aa. 942-944 y 1184-1187 de la secuencia C-terminal de GluN2A son importantes para su procesamiento por calpaína, bien porque sean directamente reconocidos por la proteasa o porque se trate de secuencias reguladoras de dicho procesamiento.

11. Desarrollo de péptidos destinados a prevenir el procesamiento por calpaína de la subunidad GluN2A inducido en condiciones excitotóxicas

La activación de los NMDARs que contienen subunidades GluN2A parece ser una estrategia muy prometedora para favorecer la supervivencia neuronal en isquemia cerebral (Liu et al., 2007). Aunque la sobreactivación de los NMDARs es perjudicial en las fases iniciales, la señalización a través de los mismos parece ser necesaria para la recuperación funcional, neuroplasticidad y supervivencia neuronal. Por tanto, decidimos investigar si preservar las subunidades GluN2A mediante la interferencia de su procesamiento por calpaína, manteniendo así la señalización pro-supervivencia del NMDAR, podía constituir una nueva estrategia de neuroprotección para el tratamiento del ictus. Para poner a prueba esta hipótesis, diseñamos dos CPPs conteniendo los aa. 936-949 (TG2A₉₃₆) y 1179-1192 (TG2A₁₁₇₉) de GluN2A donde, según los resultados anteriores, se encontrarían sitios importantes para su procesamiento por calpaína (**Fig. R19A**). Como anteriormente, las secuencias de estos péptidos se fusionaron con el péptido Tat, que facilita el paso de la membrana plasmática y la BHE. Así mismo, utilizamos el péptido TMyc previamente descrito como control negativo. En primer lugar, verificamos la permeabilidad de este tipo de péptidos mediante la incubación de

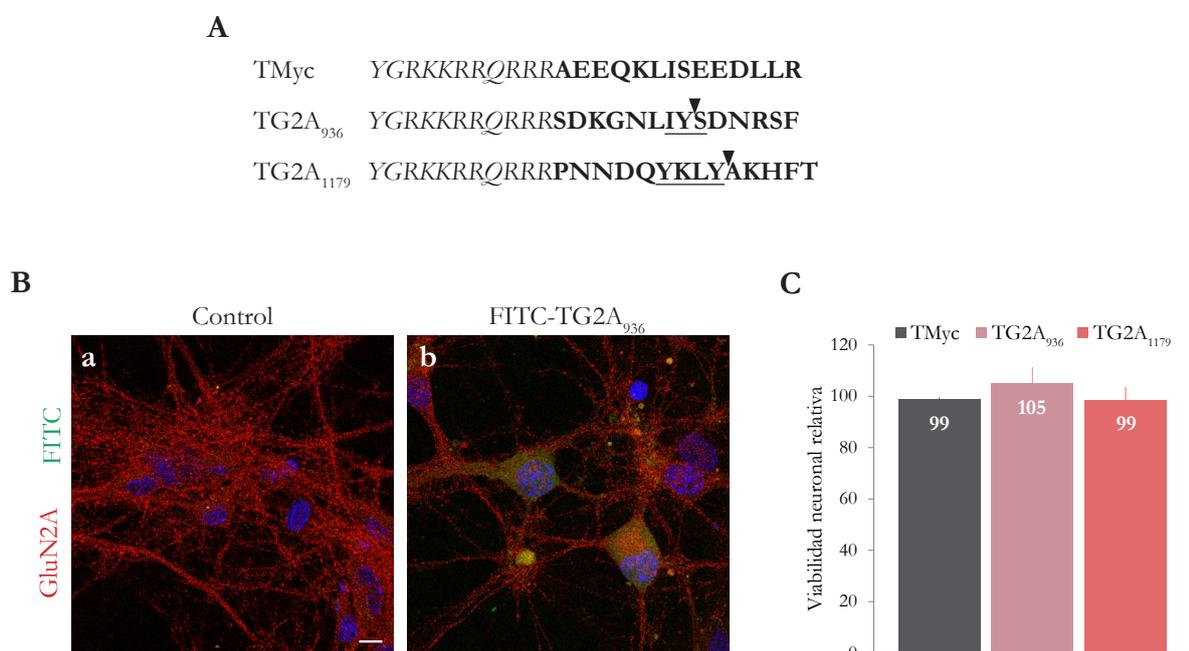


Figura R19. Esquema de los péptidos TG2A desarrollados, y estudio de su permeabilidad y ausencia de efectos basales en cultivos primarios neuronales. A. Secuencia de los péptidos TMyc, TG2A₉₃₆ y TG2A₁₁₇₉ en la que se señala el dominio de transactivación de la proteína Tat (cursiva) así como las secuencias de las proteínas c-Myc y GluN2A contenidas (negrita). En el caso de los péptidos TG2A se señalan también las secuencias putativas de procesamiento por calpaína (subrayado) y el punto de corte propuesto en la secuencia aminoacídica (puntas de flecha). **B.** Imágenes obtenidas por microscopía confocal de cultivos primarios incubados durante 2 h con el péptido FITC-TG2A₉₃₆ 15 μM (panel b) o sin tratar (panel a) seguido de inmunofluorescencia con el anticuerpo que reconoce la subunidad GluN2A. La permeabilidad en neuronas del péptido FITC-TG2A₉₃₆ (verde) se confirmó por su colocalización con la señal de GluN2A (rojo). Barra de escala: 10 μm. **C.** Análisis mediante ensayo MTT del efecto basal en los cultivos primarios neuronales de los péptidos TG2A (25 μM) incubados durante 24 h. Los datos correspondientes a 3 experimentos independientes fueron representados como porcentaje en relación a los obtenidos en cultivos no tratados, a los que se asignó el valor 100%, y analizados mediante el modelo lineal generalizado.

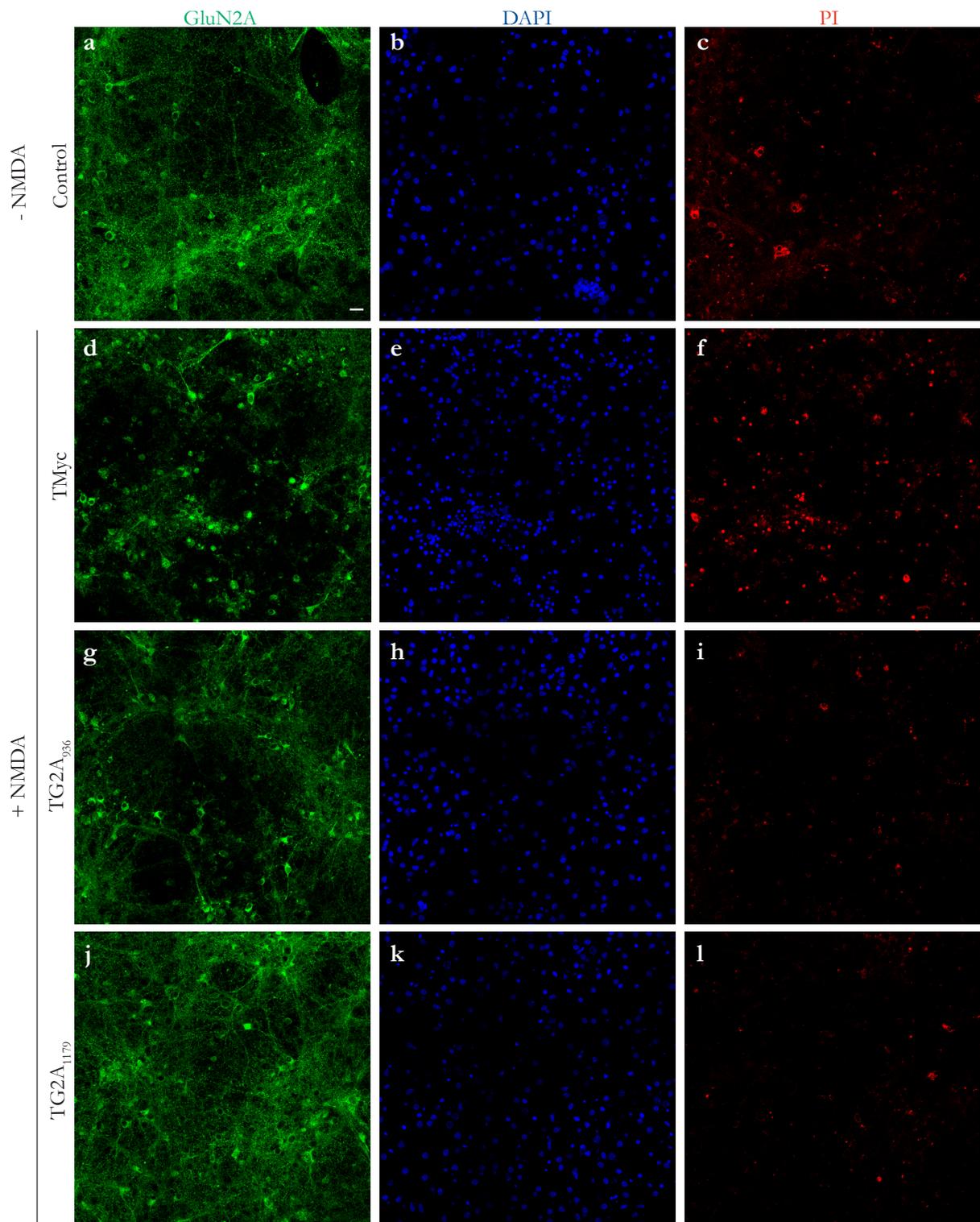


Figura R20. Análisis preliminar del efecto de los péptidos TG2A sobre la muerte neuronal inducida en condiciones de excitotoxicidad. Cultivos neuronales de 13 DIVs fueron preincubados durante 1 h con los péptidos TMyc, TG2A₉₃₆ y TG2A₁₁₇₉ (25 μ M) previamente al tratamiento con NMDA 20 μ M durante 4 h (paneles d-l) o mantenidos sin tratar con péptido ni estimular con NMDA (paneles a-c). En los 5 min anteriores a finalizar el tratamiento con NMDA, realizamos una tinción con el agente intercalante PI 50 μ M (rojo) que permitió identificar las células no viables en cada una de las condiciones (paneles c, f, i y l). Posteriormente, se realizó la inmunodetección de GluN2A (verde) con un anticuerpo específico para dicha proteína (paneles a, d, g y j) así como el marcaje con DAPI (azul), que permitió visualizar los núcleos (paneles b, e, h y k). Las imágenes son secciones individuales obtenidas mediante microscopía confocal en las que se muestran los tres canales por separado. Barra de escala: 10 μ m.

los cultivos primarios con TG2A₉₃₆ marcado con el fluoróforo FITC (FITC-TG2A₉₃₆; 15 μ M) durante 2 h, seguido de la detección de GluN2A mediante inmunofluorescencia. Los resultados confirmaron la capa-

cidad de estos péptidos para penetrar al interior de las neuronas presentes en los cultivos primarios (**Fig. R19B, panel b**), identificadas mediante la expresión de esta subunidad del NMDAR (**Fig. R19B, panel a**). A continuación, descartamos un efecto basal de estos péptidos en las neuronas analizando su viabilidad en cultivos incubados con TMyc, TG2A₉₃₆ y TG2A₁₁₇₉ durante 24 h, no observando diferencias significativas respecto a los cultivos control no tratados (n=3) (**Fig. R19C**). De partida, utilizamos una concentración de 25 µM, previamente seleccionada en la caracterización de TP95₄₁₄.

Posteriormente, exploramos de manera preliminar el efecto de estos péptidos sobre la muerte neuronal producida en condiciones excitotóxicas. Para ello, los cultivos fueron incubados con TMyc, TG2A₉₃₆ y TG2A₁₁₇₉ (25 µM, 1 h) previamente al tratamiento con NMDA (20 µM, 4 h). En los 5 min finales de tratamiento, realizamos una tinción con yoduro de propidio (PI, 50 µM) para visualizar las células no viables (**Fig. R20**) y seguidamente, realizamos un ensayo de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo de GluN2A. Pudimos establecer que el tratamiento con NMDA provocaba un aumento en la muerte en los cultivos tratados con TMyc (**Fig. R20, panel f**) que correlacionaba con una disminución y retracción de la señal de GluN2A hacia el soma neuronal (**Fig. R20, panel d**), en comparación con los cultivos control (**Fig. R20, paneles c y a**, respectivamente). Sin embargo, el tratamiento con TG2A₉₃₆, y de manera más clara con TG2A₁₁₇₉, produjo una disminución en el número de células marcadas con PI (**Fig. R20, paneles i y l**, respectivamente), en paralelo con una mayor intensidad de la señal específica para GluN2A y un entramado dendrítico muy similar al de las células control (**Fig. R20, paneles g y j**, respectivamente). Por otra parte, el análisis del ADN con DAPI reflejó una disminución del número de núcleos condensados en los cultivos tratados con NMDA y preincubados con TG2A₉₃₆ o TG2A₁₁₇₉ respecto a los de TMyc (**Fig. R20, comparar paneles h y k con e**).

Los resultados anteriores en conjunto indican que los péptidos TG2A₉₃₆ y TG2A₁₁₇₉ son capaces de atravesar la membrana plasmática y entrar en las neuronas, donde no ejercen efectos tóxicos que afecten a su viabilidad basal pero sí interfieren el proceso de muerte por excitotoxicidad.

11.1. Caracterización del efecto neuroprotector de los péptidos TG2A₉₃₆ y TG2A₁₁₇₉ en el modelo celular de excitotoxicidad en relación a la dosis y duración del tratamiento

Una vez establecida de manera preliminar la capacidad neuroprotectora de TG2A₉₃₆ y TG2A₁₁₇₉, quisimos profundizar en la caracterización de sus efectos en relación fundamentalmente a la dosis y duración del tratamiento. En primer lugar, los cultivos fueron incubados durante 1 h con TMyc, TG2A₉₃₆ y TG2A₁₁₇₉ a distintas concentraciones (1, 5, 10, 25 y 50 µM) previamente al tratamiento con NMDA (20 µM, 4h) (**Figs. R21A y B**). La cuantificación de los resultados (**Figs. R21C y D**) reflejó la interferencia del procesamiento de GluN2A de manera dependiente de la dosis, aunque diferente para cada péptido. En relación a los cultivos no tratados con NMDA, TG2A₉₃₆ exhibía acción interferente a las concentraciones de 25 y 50 µM, preservando niveles de GluN2A respectivamente del 99±29% (**p<0.01) y 136±27% (**p<0.001), significativamente superiores a los obtenidos con TMyc (40±11% y 33±9%, n=4). Para TG2A₁₁₇₉, las diferencias solo fueron estadísticamente significativas a la concentración de 25 µM (46±4% frente al 23±3% en cultivos incubados con TMyc, ***p<0.001, n=7). El efecto de estos péptidos en la viabilidad neuronal fue analizado seguidamente en cultivos tratados como anteriormente. El análisis de 4-9 experimentos independientes

mostró que TG2A₉₃₆ conseguía mantener la viabilidad de los cultivos por encima de aquellos incubados con el péptido control a 10 (65±5% frente a 54±3%, **p*<0.05), 25 (71±2% frente a 52±3%, ****p*<0.001) y 50 μM (74±3% frente a 52±4%, ****p*<0.001) mientras que TG2A₁₁₇₉ lograba este efecto a 5 (70±2% frente a 53±5%, **p*<0.05), 10 (75±3% frente a 51±4%, ***p*<0.01) y 25 μM (77±6% frente a 51±4%, ***p*<0.01) (Figs. R21E y F, respectivamente). No siendo significativas las diferencias de los cultivos incubados con TG2A₉₃₆ a 25 o 50 μM, decidimos considerar 25 μM como la concentración óptima de uso para ambos péptidos en experimentos siguientes.

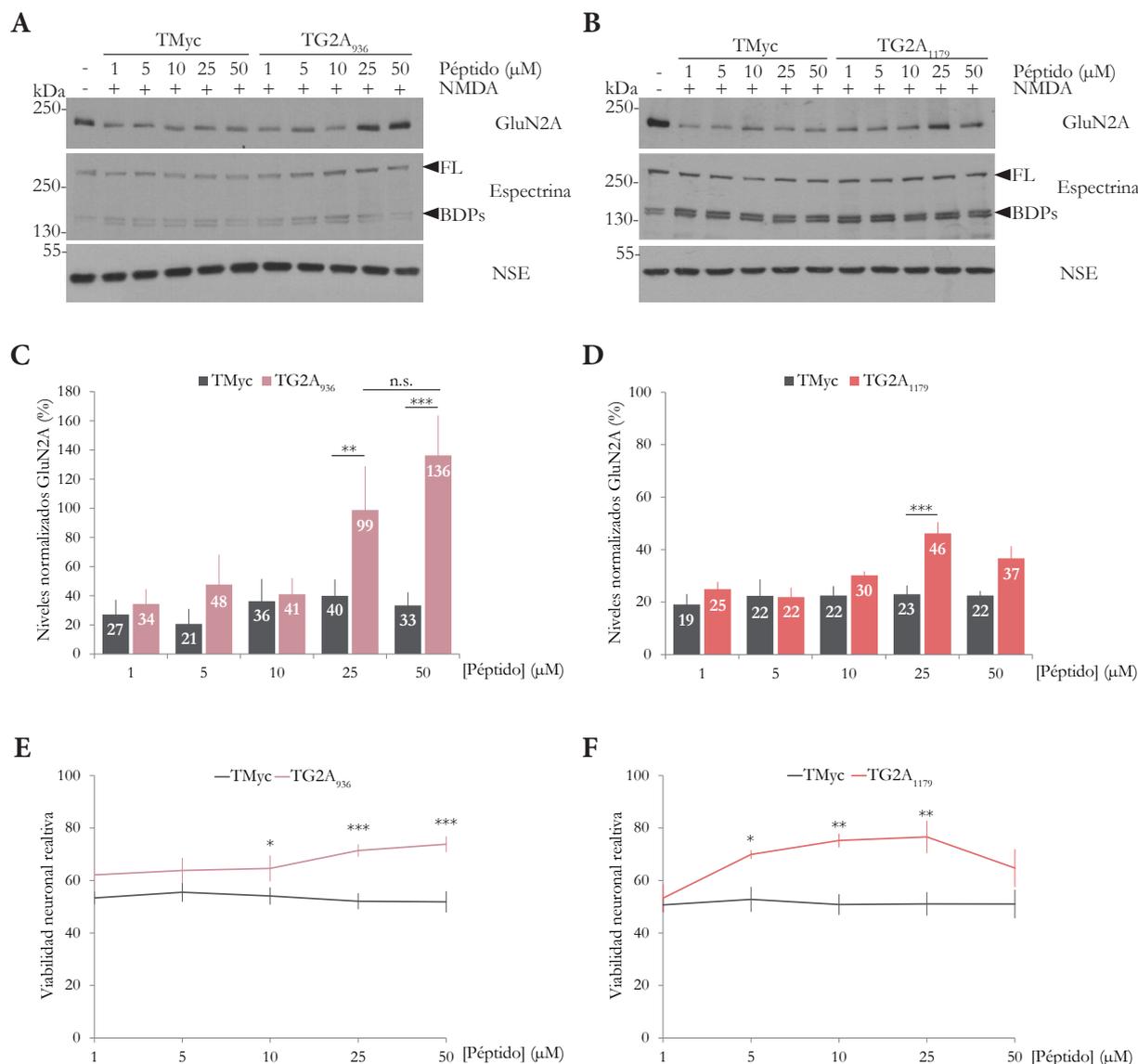


Figura R21. Análisis del efecto de la dosis de los péptidos TG2A sobre el procesamiento de GluN2A y la muerte neuronal excitotóxica. A y B. Efecto de la incubación de los cultivos neuronales durante 1 h con diferentes concentraciones (1, 5, 10, 25 y 50 μM) de TMyc y, respectivamente, TG2A₉₃₆ o TG2A₁₁₇₉, tratados a continuación con NMDA 20 μM durante 4 h, en comparación con un cultivo control mantenido en condiciones basales. **C y D.** Cuantificación de los niveles de GluN2A en presencia de TG2A₉₃₆ (n=4) o TG2A₁₁₇₉ (n=7), respectivamente, en las condiciones anteriores. Se representa el promedio ± s.e.m. de los valores normalizados frente a NSE expresados como porcentaje relativo a los obtenidos en cultivos sin estimular. El análisis estadístico se realizó mediante el modelo lineal generalizado (***p*<0.01, ****p*<0.001). **E y F.** Análisis de la supervivencia neuronal de cultivos incubados con TG2A₉₃₆ (n=4) o TG2A₁₁₇₉ (n=9) y estimulados con NMDA como anteriormente. Los resultados se presentan como valores relativos medios ± s.e.m. respecto a los obtenidos en cultivos control sin tratar, a los que arbitrariamente se asignó un valor del 100%. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el modelo lineal generalizado (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

A continuación, estudiamos el curso temporal del efecto de los péptidos sobre el procesamiento de GluN2A. Para ello, los cultivos primarios fueron incubados como anteriormente con TMyc o los péptidos TG2A (1 h), previamente a su tratamiento con NMDA (20 μ M) durante 2-6 h. En todos los casos, observamos la disminución de los niveles de subunidad desde tiempos tempranos de tratamiento. Sin embargo, los cultivos pretratados con TG2A₉₃₆ y, en mayor medida, los incubados con TG2A₁₁₇₉ experimentaron una reducción de los niveles de GluN2A considerablemente menor a la obtenida en presencia de TMyc (**Figs. R22A y R22B**). Las diferencias observadas entre los cultivos tratados con TG2A₉₃₆ o TMyc no llegaron a ser estadísticamente significativas (n=6) (**Fig. R22C**) mientras que sí que lo eran para TG2A₁₁₇₉ a todos

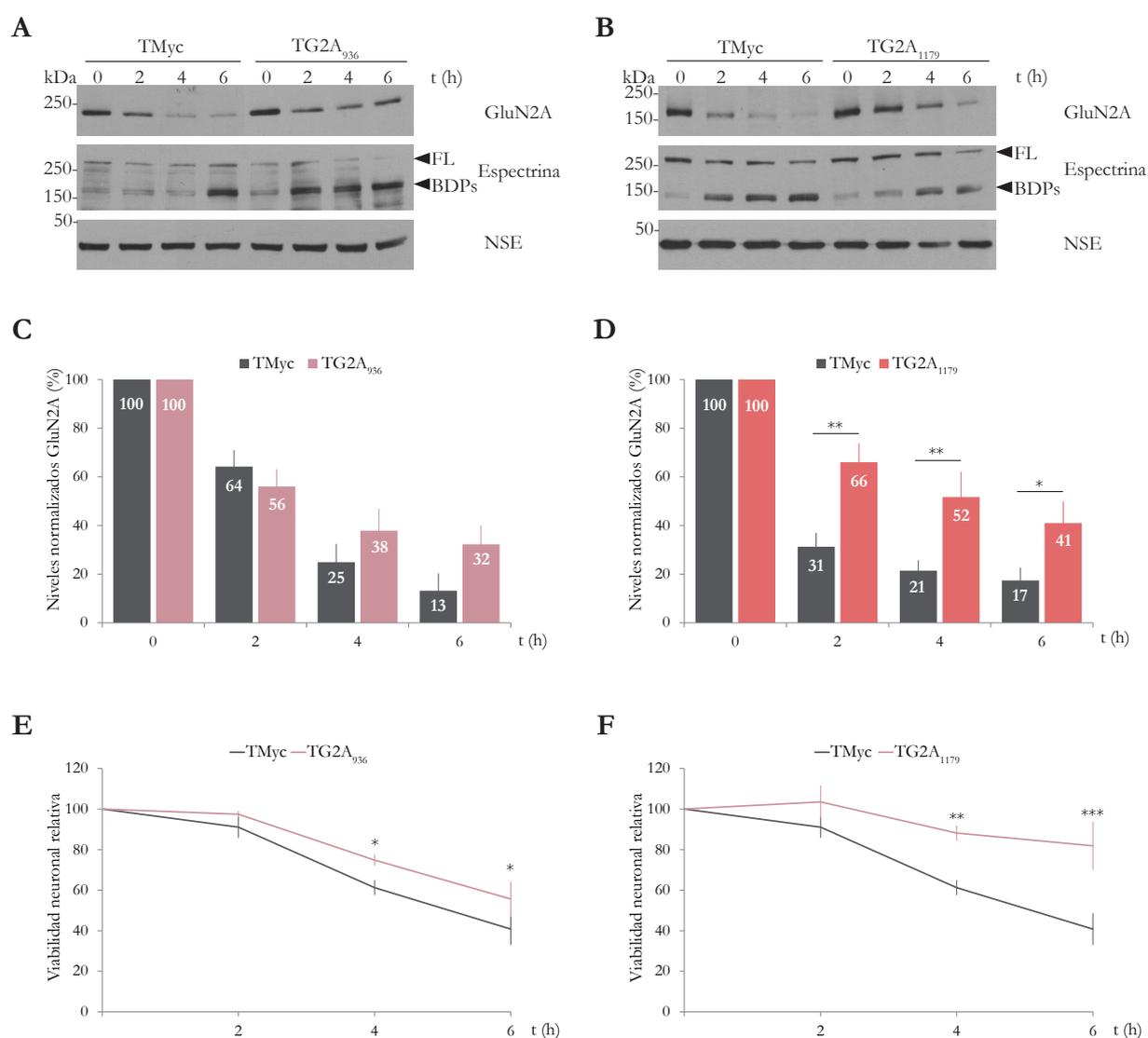


Figura R22. Estudio del efecto de los péptidos TG2A sobre la estabilidad de GluN2A y la muerte neuronal excitotóxica en relación al tiempo de tratamiento. A y B. Evaluación del procesamiento de GluN2A por WB en cultivos primarios preincubados durante 1 h con los péptidos TMyc y, respectivamente, TG2A₉₃₆ o TG2A₁₁₇₉ (25 μ M), tratados a continuación con NMDA durante 2, 4 ó 6 h. **C y D.** Cuantificación de la cinética de procesamiento de GluN2A en presencia de TMyc y TG2A₉₃₆ (n=6) o TMyc y TG2A₁₁₇₉ (n=6), respectivamente. El promedio de los valores normalizados \pm s.e.m. se representa como porcentaje respecto a cultivos incubados con el péptido correspondiente sin estimular con NMDA. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) (* p <0.05, ** p <0.01). **E y F.** Análisis de la supervivencia neuronal de cultivos incubados como anteriormente con TMyc y TG2A₉₃₆ (n=6-14) o TMyc y TG2A₁₁₇₉ (n=6-14), respectivamente, y tratados con NMDA como se indicó. Los cálculos estadísticos se realizaron a través del modelo lineal generalizado (E) o mediante el análisis de la varianza (ANOVA) en F (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

los tiempos de tratamiento (**Fig. R22D**). Así por ejemplo, los niveles de GluN2A a las 4 h de tratamiento eran del $52 \pm 10\%$ en cultivos preincubados con TG2A₁₁₇₉ y tan solo del $21 \pm 4\%$ en los tratados con TMyc (** $p < 0.01$; $n = 6$). En paralelo, los ensayos de viabilidad reflejaron tan solo un modesto efecto neuroprotector del péptido TG2A₉₃₆ a las 4 ($75 \pm 3\%$ con TG2A₉₃₆ frente al $61 \pm 4\%$ con TMyc, * $p < 0.05$) y a las 6 h de tratamiento ($56 \pm 9\%$ con TG2A₉₃₆ frente al $41 \pm 8\%$ con TMyc, * $p < 0.05$, $n = 6-14$, **Fig. R22E**) que contrasta con el potente efecto neuroprotector de TG2A₁₁₇₉ (**Fig. R22F**). A las 4 y 6 h de tratamiento con NMDA en presencia de TG2A₁₁₇₉, la supervivencia neuronal mantuvo valores del $88 \pm 4\%$ y $82 \pm 12\%$ respectivamente respecto a los incubados con TMyc, que alcanzaban valores del $61 \pm 4\%$ (** $p < 0.01$) y $41 \pm 8\%$ (** $p < 0.001$, $n = 6-14$).

Para completar la caracterización de estos péptidos, estudiamos su efecto en el modelo celular de daño excitotóxico agudo utilizado anteriormente (**Fig. R10A**). El péptido TG2A₉₃₆ no parecía interferir de manera eficiente el procesamiento de GluN2A, en contraste con lo observado en los cultivos pretratados con TG2A₁₁₇₉ (**Fig. R23A**). Sin embargo, ambos péptidos exhibieron capacidad neuroprotectora en ensayos de viabilidad realizados 22 h después de la inducción del proceso excitotóxico (**Fig. R23B**). En los cultivos pretratados con TG2A₉₃₆ y TG2A₁₁₇₉, la viabilidad neuronal se mantenía en valores del $60 \pm 8\%$ (* $p < 0.05$) y del $83 \pm 5\%$ (** $p < 0.001$) tras el tratamiento agudo con NMDA, valores significativamente mayores que los obtenidos para TMyc ($37 \pm 5\%$, $n = 4-6$).

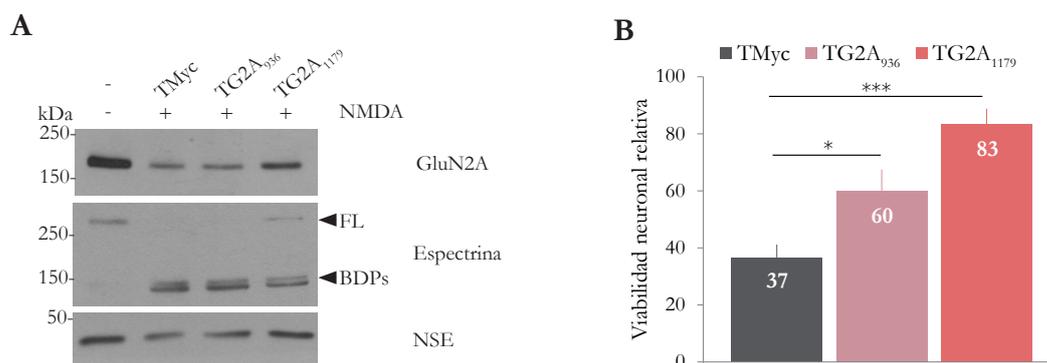


Figura R23. Efecto de los péptidos TG2A sobre la estabilidad de GluN2A y la supervivencia neuronal en el modelo agudo de excitotoxicidad. **A.** Análisis por WB del efecto de los péptidos TG2A₉₃₆ y TG2A₁₁₇₉ en cultivos primarios de neuronas corticales preincubados durante 1 h con los péptidos (25 μ M) y tratados a continuación con NMDA 100 μ M durante 1 h. Tras este tiempo, el medio se sustituyó por medio condicionado suplementado con el antagonista del NMDAR DL-AP5 (200 μ M) durante 22 h adicionales. **B.** Análisis de la supervivencia neuronal mediante ensayo MTT de cultivos tratados como anteriormente ($n = 4-6$). Los datos se representan como porcentaje en relación a los obtenidos en cultivos no tratados con NMDA, a los que se asignó el valor 100%. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).

En conjunto, los resultados anteriores demuestran que los dos péptidos desarrollados, TG2A₉₃₆ y TG2A₁₁₇₉, son neuroprotectores en cultivos primarios sometidos a excitotoxicidad y que este efecto se correlaciona con su capacidad para interferir el procesamiento de la subunidad GluN2A del NMDAR mediada por calpaína. También sugieren fuertemente que la actividad de los NMDARs formados por subunidades GluN2A es fundamental para la supervivencia neuronal tras un daño excitotóxico y que el procesamiento de esta subunidad por calpaína contribuye de manera notable a la muerte neuronal. Por tanto, GluN2A es una diana con gran potencial para el desarrollo de terapias neuroprotectoras frente al ictus y, en general, patologías asociadas con la excitotoxicidad.

11.2. Estudio del mecanismo de acción del péptido TG2A₁₁₇₉

Dado que la eficacia neuroprotectora de TG2A₉₃₆ era más modesta, decidimos centrar los estudios siguientes en el péptido TG2A₁₁₇₉ profundizando en su mecanismo de acción.

11.2.1. Interdependencia de los mecanismos de acción de TG2A₁₁₇₉ y calpaína

Como abordaje inicial, realizamos digestiones *in vitro* con calpaína I purificada (25, 50 y 100 U/ml, 30 min) en extractos proteicos de cultivos neuronales incubados con los péptidos TMyc o TG2A₁₁₇₉ durante 5 h (Fig. R24A). Los resultados sugerían que el péptido TG2A₁₁₇₉ era capaz de predisponer a la subunidad

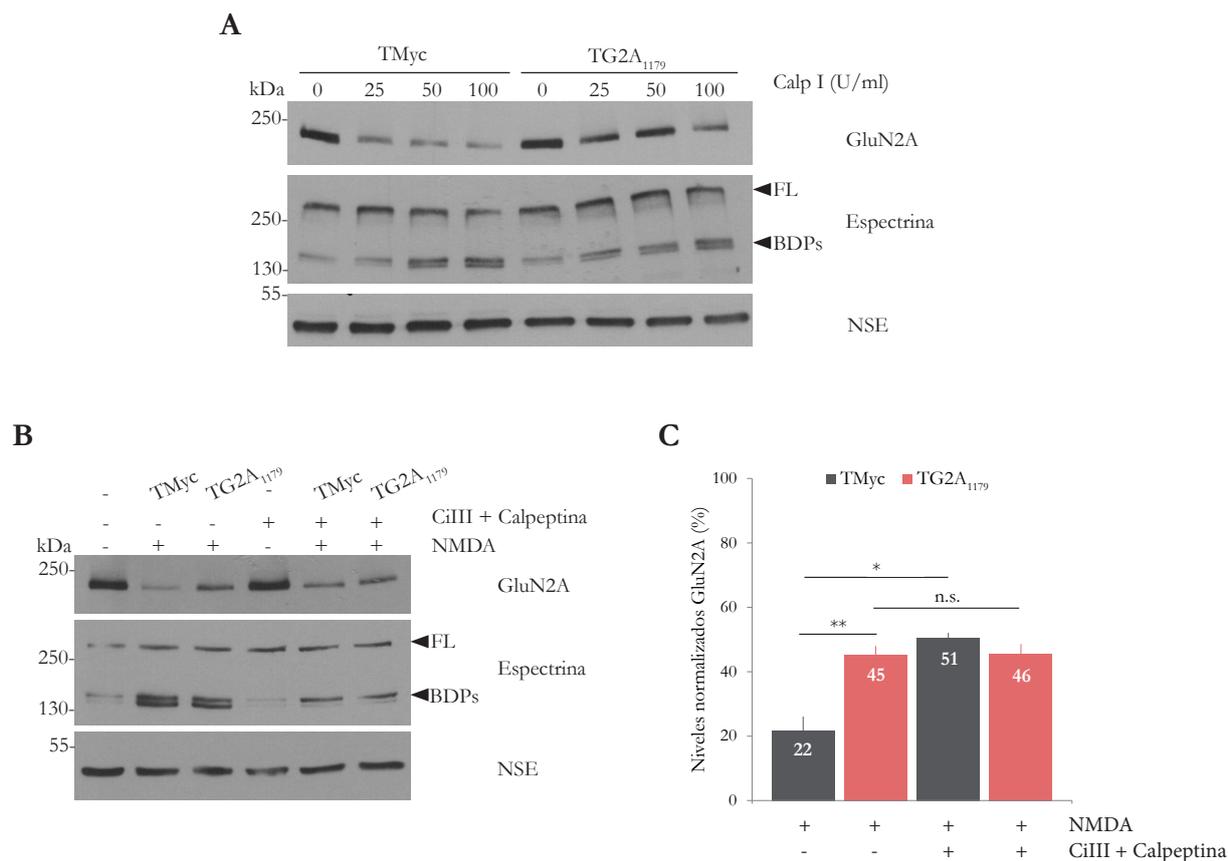


Figura R24. Estudio de la interdependencia de los mecanismos de acción del péptido TG2A₁₁₇₉ y calpaína sobre el procesamiento de GluN2A. **A.** Análisis mediante WB de extractos de cultivos primarios neuronales tratados durante 5 h con los péptidos TMyc o TG2A₁₁₇₉ (25 µM), sometidos posteriormente a digestión *in vitro* con calpaína I purificada (25, 50 y 100 U/ml) durante 30 min. **B.** Análisis comparativo del efecto de TG2A₁₁₇₉ y los inhibidores de calpaína sobre el procesamiento de GluN2A en excitotoxicidad. Cultivos primarios neuronales fueron incubados con los inhibidores de calpaína, CiIII y calpeptina (10 µM, 30 min), y tratados seguidamente con los péptidos TMyc o TG2A₁₁₇₉ (25 µM) durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, fueron estimulados con NMDA 20 µM durante 4 h. **C.** Cuantificación densitométrica de los niveles de GluN2A obtenidos en los experimentos anteriores representados como porcentaje en relación a los de cultivos no tratados con NMDA, a los que se asignó el valor 100%. Los cálculos estadísticos correspondientes a 4 experimentos independientes se realizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA; n.s., no significativo; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

GluN2A presente en las células a un estado de mayor resistencia frente al procesamiento por calpaína. Adicionalmente, quisimos comprobar si el efecto estabilizador de TG2A₁₁₇₉ sobre los niveles de GluN2A se debía exclusivamente a la interferencia de su procesamiento por calpaína o también participaban otros mecanismos. Para ello, los cultivos fueron incubados primero con una combinación de los inhibidores específicos de calpaína, calpeptina (10 µM) y CiIII (10 µM), y 30 min después con los péptidos TMyc y TG2A₁₁₇₉ (1 h), previamente a su tratamiento con NMDA (20 µM, 4 h) (Fig. R24B). Observamos un efecto significativo

de los inhibidores de calpaína sobre los niveles de GluN2A en los cultivos tratados con TMyc (**Fig. R24C**). Por el contrario, el efecto protector de TG2A₁₁₇₉ era muy similar independientemente del tratamiento o no con los inhibidores ($46 \pm 5\%$ frente a $45 \pm 7\%$, $n=4$), resultado que sugiere que las acciones del TG2A₁₁₇₉ y los inhibidores de calpaína no son independientes sino que están fuertemente relacionadas.

11.2.2. Efecto de TG2A₁₁₇₉ sobre proteínas prosupervivencia neuronales diferentes de GluN2A

El estudio del efecto de TG2A₁₁₇₉ sobre los niveles de diversas proteínas importantes para la supervivencia neuronal relacionadas con la función del NMDAR arrojó resultados muy interesantes. En paralelo al efecto sobre los niveles de GluN2A, los cultivos incubados con TG2A₁₁₇₉ (25 μ M, 1h) previamente al tratamiento con NMDA (20 μ M, 2-6 h) presentaban niveles más elevados del receptor de neurotrofinas TrkB, así como de su forma activa pTrkB (fosforilada en el residuo Y515) y su ligando BDNF (**Fig. R25A**).

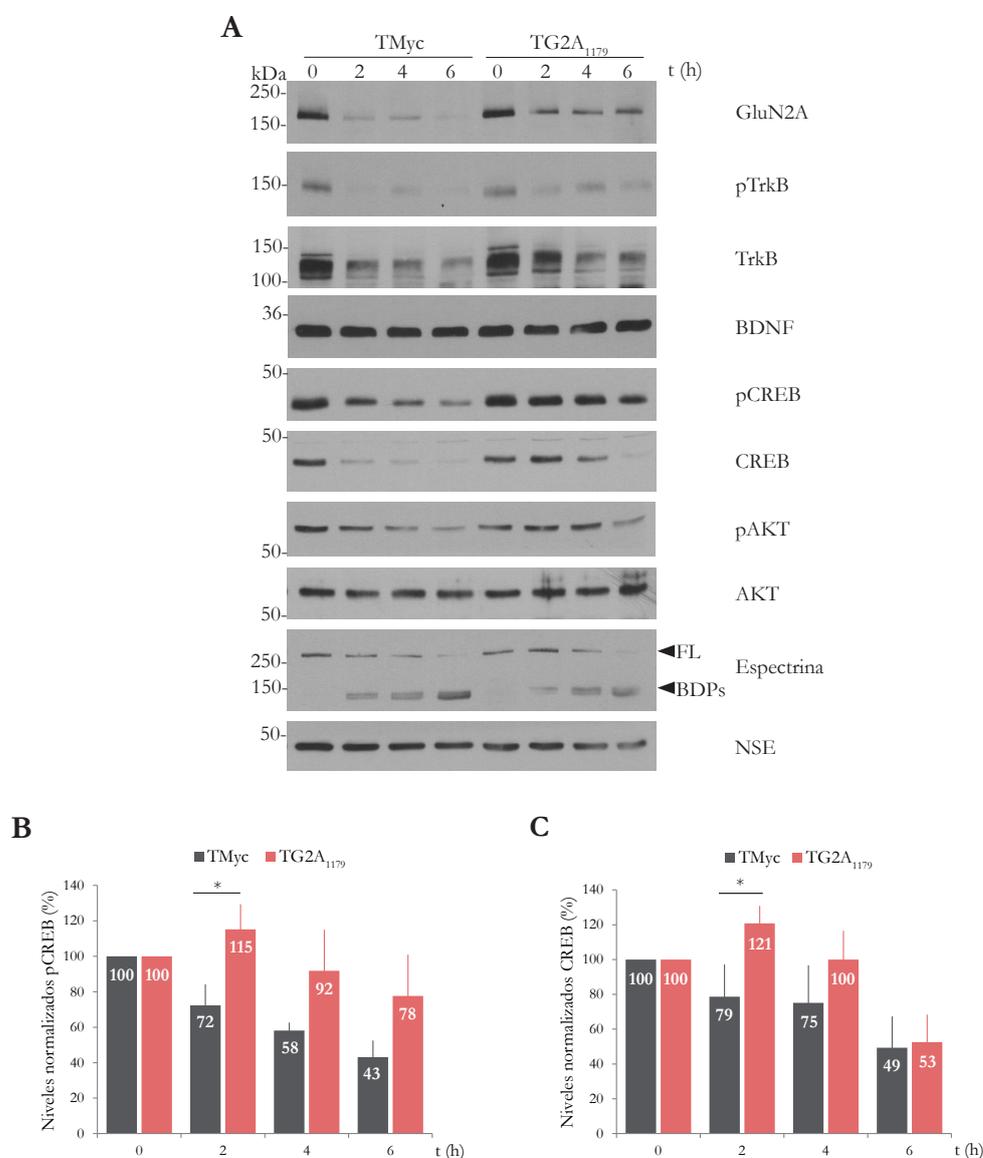


Figura R25. Cinética del efecto mediado por TG2A₁₁₇₉ sobre GluN2A y otras proteínas esenciales para la supervivencia neuronal. A. Estudio mediante WB de los niveles de GluN2A, pTrkB, TrkB, BDNF, pCREB, CREB, pAKT, AKT, espectrina y NSE en cultivos sometidos a condiciones excitotóxicas como se indicó anteriormente en presencia de TMyc o TG2A₁₁₇₉ (25 μ M). **B y C.** Cuantificación densitométrica de los niveles normalizados de pCREB ($n=5$) y CREB ($n=6$), respectivamente, en las condiciones anteriores. El análisis estadístico se realizó mediante el modelo lineal generalizado ($*p<0.05$).

Es decir, que este péptido neuroprotector no solo ayuda a mantener la activación por glutamato de los NMDARs formados por subunidades GluN2A sino también la de TrkB por BDNF, siendo ambas vías de señalización facilitadoras de la supervivencia neuronal y de los procesos de LTP (revisado en Bartlett and Wang, 2013). Otras proteínas críticas para la supervivencia neuronal, que son elementos *downstream* comunes de las cascadas de señalización de los NMDARs y TrkB, también experimentaron cambios similares. Así, TG2A₁₁₇₉ fue capaz de revertir parcialmente el *shut-off* (Hardingham and Bading, 2010) y la degradación del FT pro supervivencia CREB (Watt and Molloy, 1993), así como la inactivación de la quinasa AKT (Luo et al., 2003), inducidas en condiciones excitotóxicas. Concretamente para CREB, a las 2 h de tratamiento con NMDA, el péptido TG2A₁₁₇₉ interfería significativamente la disminución de su fosforilación en el residuo S133 (pCREB), indicador estándar de su estado de activación, así como su procesamiento por calpaína inducido en condiciones de excitotoxicidad (**Figs. R25B y R25C**, respectivamente). La proteína pro supervivencia AKT, que no es sustrato de calpaína (Vosler et al., 2008), experimentó sin embargo una menor defosforilación de su residuo S473 en las condiciones de excitotoxicidad inducida en presencia de TG2A₁₁₇₉ frente a los cultivos tratados con TMyc. Experimentos preliminares mostraron igualmente la estabilización por TG2A₁₁₇₉ del FT pro supervivencia MEF2D (datos no mostrados), también descrito como sustrato de calpaína en condiciones de excitotoxicidad (Wei et al., 2012). La espectrina cerebral también presentaba un ligero descenso de su procesamiento en presencia de TG2A₁₁₇₉, posiblemente reflejando la disminución de la muerte neuronal y, por tanto, menor activación de calpaína en presencia del péptido. Estos resultados sugieren que el mantenimiento de los niveles y/o actividad de estas proteínas de señalización pro supervivencia por el péptido TG2A₁₁₇₉ contribuye a reducir la muerte neuronal en excitotoxicidad.

11.2.3. Vías de señalización implicadas en el efecto neuroprotector de TG2A₁₁₇₉

Seguidamente quisimos establecer qué vías de señalización eran necesarias para que el péptido TG2A₁₁₇₉ ejerciese su efecto neuroprotector. Para ello, utilizamos inhibidores selectivos de las principales rutas de señalización activadas por los receptores NMDAR y/o TrkB. Los cultivos primarios fueron preincubados (30 min) con el inhibidor de PI3K Wortmanina (100 nM); el de MEK-1/2, las quinasas reguladoras de ERK1/2, UO126 (10 μ M); el de la CaMKK, quinasa reguladora de CaMKI y CaMKIV, STO-609 (10 μ M) o el de la transcripción dependiente de CREB, KG-501 (10 μ M). Posteriormente, las células se incubaron con los péptidos TMyc o TG2A₁₁₇₉ (25 μ M, 1 h) antes de someterlas a tratamiento crónico con NMDA (20 μ M, 4 h) (**Fig. R26**). El efecto neuroprotector de TG2A₁₁₇₉ en los cultivos tratados con Wortmanina (**Fig. R26A**, n=4), UO126 (**Fig. R26B**, n=7) o STO-609 (**Fig. R26C**, n=6) decayó levemente en comparación con los cultivos incubados con el péptido pero sin inhibidor. Sin embargo, estas diferencias no eran estadísticamente significativas. Por contraste, sí que encontramos una interacción estadísticamente significativa entre el péptido y el inhibidor de CREB (**Fig. R26D**). En los cultivos pretratados con KG-501 y TG2A₁₁₇₉ la supervivencia neuronal era del 71 \pm 3%, valor notablemente inferior al obtenido en ausencia de inhibidor (83 \pm 4%, * p <0.05, n=6). A pesar de esto, en los cultivos tratados con KG-501 sigue existiendo un efecto neuroprotector significativo del péptido TG2A₁₁₇₉ respecto de TMyc (respectivamente 71 \pm 3% y 60 \pm 3%, * p <0.05). Por tanto, podemos concluir que la presencia del péptido TG2A₁₁₇₉ ayuda a mantener los niveles de pCREB (**Fig. R25A y B**), cuya actividad parece ser crítica para el desarrollo del papel neuroprotector de

este péptido en condiciones de excitotoxicidad, aunque no se descarta la participación de vías adicionales de señalización.

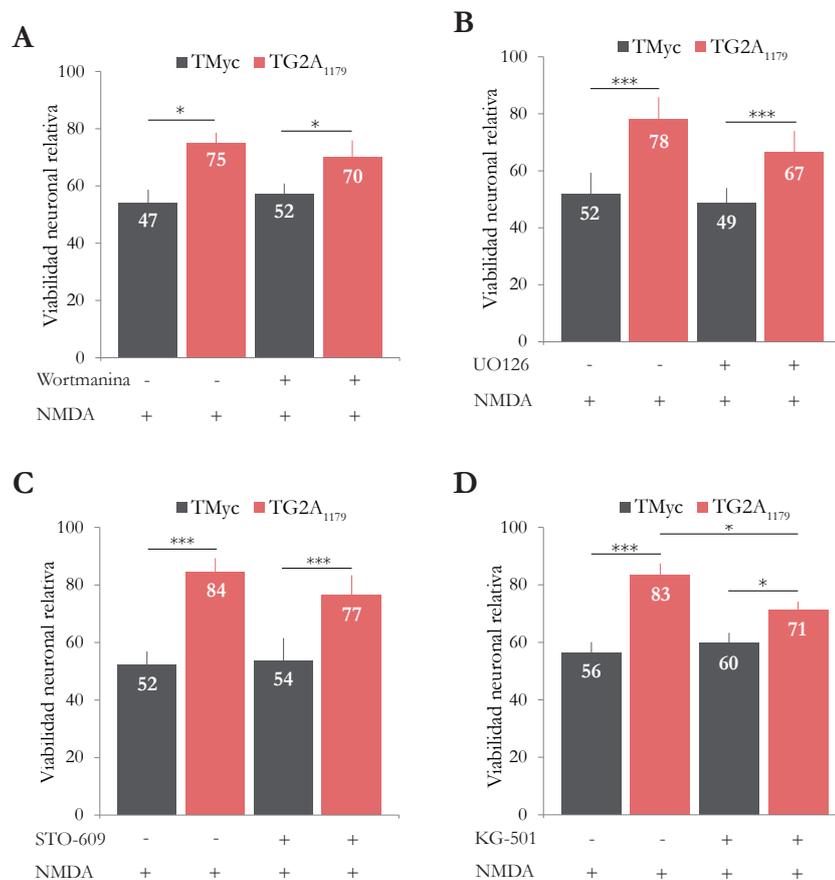


Figura R26. Vías señalización implicadas en el efecto neuroprotector de TG2A₁₁₇₉. Evaluación de la supervivencia neuronal en cultivos pre-tratados durante 30 min con el inhibidor de PI3K (Wortmanina 100 nM; n=4) (A), MAPK/ERK (UO126 10 μM; n=7) (B), CamKK (STO-609 10 μM; n=6) (C) y CREB (KG-501 10 μM; n=6) (D) e incubados seguidamente con los péptidos TMyc o TG2A₁₁₇₉ (25 μM, 1 h) y tratados de manera crónica con NMDA (20 μM, 4 h). Los resultados se comparan con los de cultivos no tratados con los inhibidores. Los valores promedio ± s.e.m. aparecen representados en relación a cultivos control mantenidos en condiciones basales, a los que se asignó arbitrariamente el valor 100%. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

11.2.4. Efecto de TG2A₁₁₇₉ sobre la expresión de genes prosupervivencia CREB y MEF2-dependientes

Una vez establecido que el efecto protector del péptido TG2A₁₁₇₉ estaba mediado por el mantenimiento de la actividad del FT prosupervivencia CREB, y quizá también la de MEF2, investigamos si este péptido podía estar interfiriendo la inhibición de la expresión de sus genes diana, propia del proceso de excitotoxicidad (Hardingham et al., 2002). Para ello, realizamos ensayos de actividad promotora en cultivos primarios transfectados durante 24 h con distintos vectores reporteros, preincubados o no con los péptidos TMyc o TG2A₁₁₇₉ (1 h) y, finalmente, tratados de manera crónica con NMDA (20 μM, 4 h) (Fig. R27). Estos vectores contenían el gen de la luciferasa bajo el control de diferentes secuencias promotoras: dos CREs pertenecientes al promotor de TrkB para pCRE (Deogracias et al., 2004); un fragmento del promotor del gen *Nur77* con dos sitios MEF2 para pMEF2 (Woronicz et al., 1995); y diversos fragmentos de los promotores de los genes codificantes correspondientes en el caso de los plásmidos pTrkB, pBDNF, pGluN2A y pGluN1, todos ellos incluyendo una o varias secuencias CRE y/o MEF2 (Lau et al., 2004; Desai et al., 2002; Caccamo et al., 2010; Deogracias et al., 2004; Iwasaki et al., 2012). Los valores de actividad luciferasa que

se muestran son valores relativos obtenidos en las condiciones de excitotoxicidad, calculados respecto a los de cultivos control tratados o no con péptido, pero no estimulados con NMDA. En los cultivos transfectados con los plásmidos pCRE (**Fig. R27A**; n=3) y pMEF2 (**Fig. R27B**; n=7), el tratamiento con NMDA producía una clara disminución en la actividad promotora ($35\pm 6\%$ y $44\pm 6\%$, respectivamente) de acuerdo con lo anteriormente descrito (Hardingham et al., 2002; Wei et al., 2012). A diferencia de TMyc, que no tenía un efecto significativo sobre la inhibición de la transcripción, el péptido TG2A₁₁₇₉ era capaz de revertir muy eficientemente este efecto, alcanzándose niveles de actividad muy superiores (respectivamente $91\pm 9\%$ y $131\pm 23\%$). Estos últimos valores resultaban estadísticamente diferentes, según se indica, de los obtenidos en las células tratadas con NMDA, en ausencia de péptido o con TMyc. En el caso de los plásmidos pTrkB (**Fig. R27C**; n=9), pBDNF (**Fig. R27D**; n=7), pGluN2A (**Fig. R27E**; n=5) y pGluN1 (**Fig. R27F**; n=5), que contienen regiones promotoras más complejas, los resultados fueron muy similares a los anteriores. Sin embargo, en general, los efectos del tratamiento con NMDA no fueron tan acusados como en el caso de los plásmidos pCRE o pMEF2.

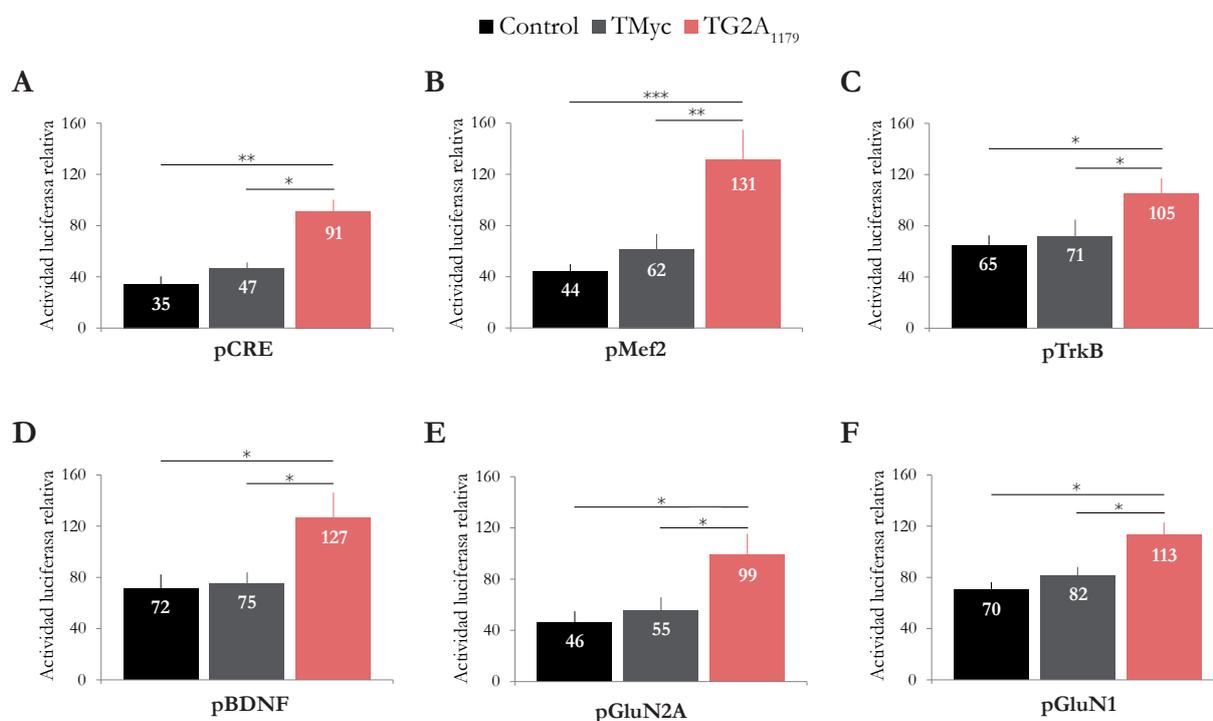


Figura R27. Efecto del péptido TG2A₁₁₇₉ sobre la actividad de promotores de genes prosupervivencia. Cultivos primarios neuronales de 11-12 DIVs fueron transfectados con los promotores pCRE (**A**, n=3), pMEF2 (**B**, n=7), pTrkB (**C**, n=9), pBDNF (**D**, n=7), pGluN2A (**E**, n=5) y pGluN1 (**F**, n=5) durante 24 h. Transcurrido este tiempo, los cultivos fueron incubados con los péptidos TMyc o TG2A₁₁₇₉ durante 1 h o mantenidos sin tratar. Posteriormente, se indujo la excitotoxicidad mediante el tratamiento con NMDA 20 μ M durante 4 h. Se muestran los valores medios \pm s.e.m. de actividad luciferasa referidos a los cultivos no tratados o tratados con el correspondiente péptido pero sin estimular con NMDA, a los que se asignó un valor del 100%. En función de la homogeneidad de las varianzas, el análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) o el modelo lineal generalizado (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

En conjunto, los datos anteriores sugieren que TG2A₁₁₇₉ ejerce su efecto neuroprotector a través del mantenimiento en condiciones de excitotoxicidad de la transcripción dependiente de los factores CREB y MEF2, permitiendo la expresión sostenida de diferentes proteínas prosupervivencia como son las propias subunidades del NMDAR o el receptor TrkB y su ligando BDNF, que desarrollan en conjunto un papel clave en el mantenimiento de la fisiología neuronal y de las vías de señalización prosupervivencia. El efecto

de TG2A₁₁₇₉ sobre la actividad de los promotores que controlan la expresión de las subunidades GluN2A y GluN1 sugiere que el péptido inicia un mecanismo que, tras interferir el procesamiento por calpaína de GluN2A, se retroalimenta positivamente a través de sus moléculas *downstream* CREB y MEF2.

11.2.5. Efecto de TG2A₁₁₇₉ sobre el estado de fosforilación de los residuos Y1184 y Y1187 de GluN2A y su susceptibilidad al procesamiento por calpaína en excitotoxicidad

En experimentos anteriores habíamos visualizado un cierto retardo en la movilidad electroforética de GluN2A en presencia de TG2A₁₁₇₉ en condiciones excitotóxicas (Figs. R21B, R22B y R25A). Teniendo en cuenta además que este péptido contiene dos residuos de tirosina (Y1184 y Y1187), nos planteamos la posibilidad de que TG2A₁₁₇₉ pudiese estar regulando el procesamiento de GluN2A mediante la alteración del estado de fosforilación de dichas tirosinas. En apoyo de esta hipótesis, resultados anteriores habían mostrado que la fosforilación *in vitro* de preparaciones de membrana sináptica con las SFKs Src (Bi et al., 2000) o Fyn (Rong et al., 2001) disminuía o aumentaba respectivamente la susceptibilidad de GluN2A a la digestión con calpaína purificada. Para poner a prueba nuestra hipótesis, en primer lugar estudiamos el efecto global del estado de fosforilación en tirosinas sobre la estabilidad de GluN2A en condiciones basales utilizando inhibidores genéricos de tirosina fosfatasas, ortovanadato (50 μ M), y de tirosina quinasas, genisteína (10 μ M), durante distintos tiempos (15-120 min). El ortovanadato produjo una acumulación de formas de GluN2A de menor movilidad electroforética que probablemente corresponden a la proteína hiperfosforilada (Fig. R28A). Aunque los datos sugerían una estabilidad mayor de dichas formas de GluN2A, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (datos no mostrados). La caracterización de la proteína ERK5 con un fosfoanticuerpo que reconoce sus residuos T218/Y220 permitió confirmar la eficacia del tratamiento, que dio lugar a un aumento de pERK5 tras 1 h de tratamiento. Para investigar si los efectos del ortovanadato eran específicos de GluN2A o debidos a la regulación de la actividad de la calpaína por su estado de fosforilación, estudiamos otro sustrato de esta proteasa. Para la espectrina, el tratamiento con ortovanadato tenía, si acaso, un efecto sutil sobre su estabilidad y de sentido contrario al observado para GluN2A. Por otra parte, el tratamiento con genisteína produjo una disminución lenta de los niveles de GluN2A (Fig. R28B), aunque de nuevo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (datos no mostrados).

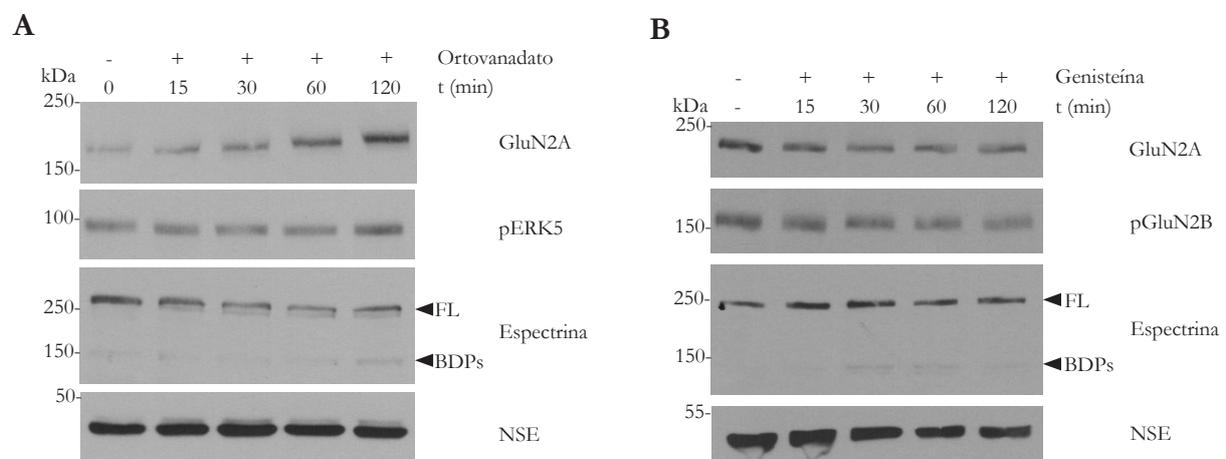


Figura R28. Efecto del estado de fosforilación en tirosinas de GluN2A sobre su estabilidad en condiciones basales. **A.** Cultivos primarios neuronales fueron tratados con el inhibidor genérico de tirosina fosfatasas ortovanadato (50 μ M) durante 15, 30, 60 y 120 min. **B.** Cultivos primarios neuronales fueron tratados con el inhibidor genérico de tirosina quinasas genisteína (10 μ M) durante los mismos tiempos.

Como control, analizamos la subunidad GluN2B del NMDAR con un fosfoanticuerpo específico para su residuo Y1492, observando un claro descenso en sus niveles a lo largo del tratamiento. En el caso de espectrina, los resultados mostraron un aumento moderado en sus niveles durante las dos primeras horas de tratamiento. Investigamos seguidamente una posible relación entre el estado de fosforilación de las tirosinas de GluN2A con su susceptibilidad al procesamiento por calpaína. Para ello, los cultivos neuronales fueron incubados con ortovanadato (50 μ M, 30 min) previamente al tratamiento con NMDA 100 μ M durante 2 h (**Fig. R29A**). En condiciones excitotóxicas, los cultivos pretratados con ortovanadato preservaban mayores niveles de GluN2A que los no tratados con este inhibidor. Así, la incubación con el inhibidor previa al tratamiento con NMDA mantenía los niveles de GluN2A en el $28\pm 3\%$ respecto a los cultivos tratados solo con ortovanadato, valor significativamente superior al obtenido en su ausencia ($*p < 0.05$, $n=3$), cuando el tratamiento con NMDA hizo caer los niveles de subunidad al $16\pm 4\%$ (**Fig. R29B**). Para completar estos experimentos, a continuación caracterizamos el efecto de la inhibición de las tirosina quinasas sobre el

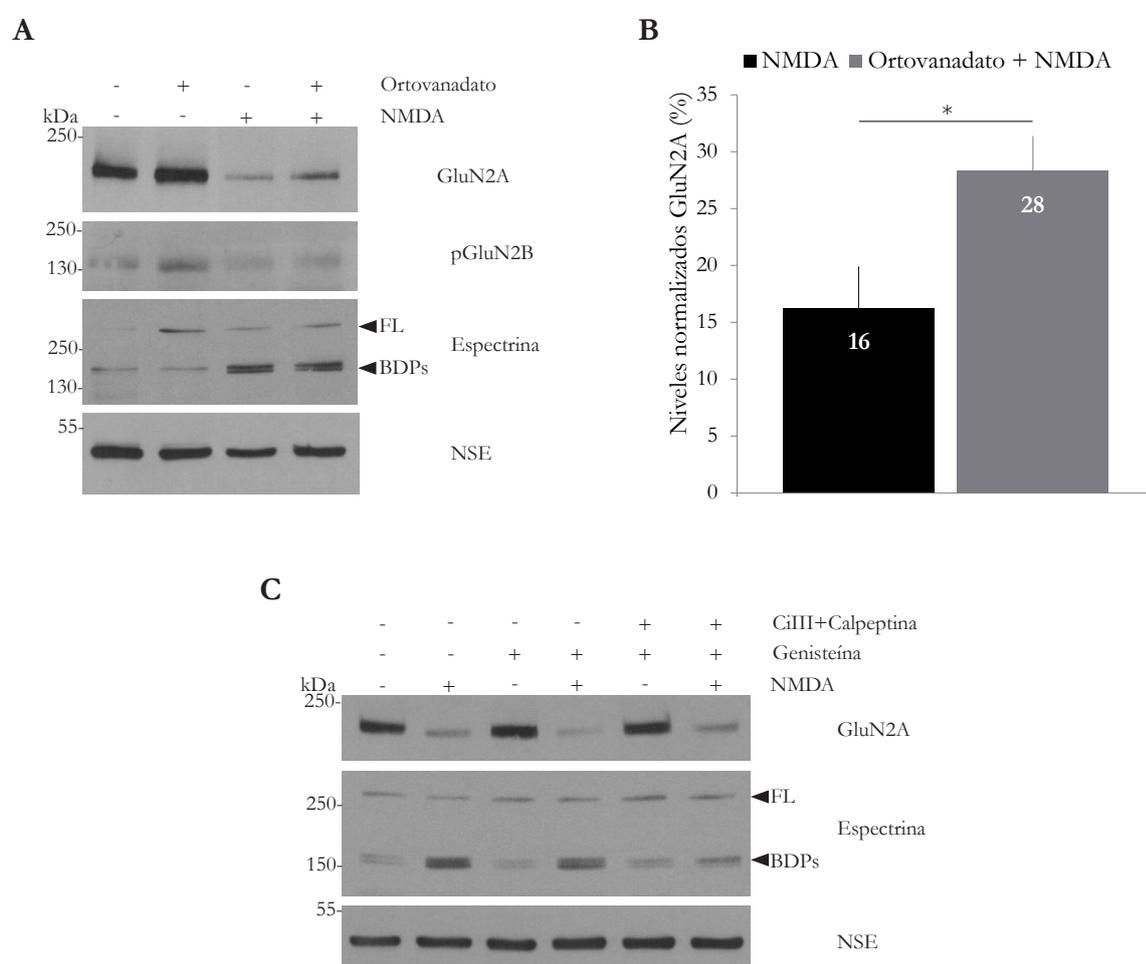


Figura R29. Análisis del efecto del estado de fosforilación en tirosinas de GluN2A sobre su susceptibilidad al procesamiento por calpaína. **A.** Estudio por WB de los niveles de GluN2A en cultivos neuronales primarios preincubados durante 30 min con ortovanadato 50 μ M y estimulados posteriormente durante 2 h con NMDA 100 μ M, según se indica. **B.** Cuantificación densitométrica de los niveles de GluN2A en las condiciones anteriores ($n=3$). El promedio de los valores normalizados \pm s.e.m. obtenidos en las condiciones de excitotoxicidad y en ausencia o presencia de ortovanadato se representa como porcentaje respecto a sus correspondientes cultivos control sin estimular con NMDA, a los que se asignó arbitrariamente un valor del 100%. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la t de Student desapareada ($*p < 0.05$). **C.** Estudio mediante WB de los niveles de GluN2A en cultivos preincubados, según se indica, con los inhibidores de calpaína, CiIII y calpeptina (10 μ M, 30 min), seguido del tratamiento con genisteína (10 μ M, 30 min) y estimulados después con NMDA (20 μ M, 4 h).

procesamiento de GluN2A en condiciones de excitotoxicidad. Experimentos preliminares muestran que la incubación de los cultivos con genisteína (10 μ M, 30 min) previa al tratamiento con NMDA (20 μ M, 4h) aumenta el procesamiento dependiente de calpaína de la subunidad (**Fig. R29C**), de manera contraria a lo observado tras la inhibición de las tirosina fosfatasa (**Fig. R29A**). En conjunto, los datos anteriores muestran una relación entre la susceptibilidad de GluN2A al procesamiento por calpaína en condiciones de excitotoxicidad y el estado de fosforilación de sus tirosinas.

La actividad enzimática de las SFKs y de PTPs sufre modificaciones importantes durante los procesos de excitotoxicidad e isquemia (Iqbal Hossain et al., 2015, Xu et al., 2009) que podrían alterar el estado de fosforilación de proteínas como GluN2A, afectando a su susceptibilidad al procesamiento por calpaína, activada de manera temprana durante el proceso de excitotoxicidad. Analizamos por tanto el efecto de la excitotoxicidad sobre los niveles de subunidad fosforilada en tirosinas, utilizando para ello la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-pY de extractos de cultivos tratados o no con NMDA (20 μ M, 4 h). La detección de GluN2A en la fracción inmunoprecipitada dejó patente una disminución muy acusada en los niveles de las formas fosforiladas en tirosina de esta subunidad tras el tratamiento con NMDA (**Fig. R30A**). La cuantificación de los niveles de GluN2A (**Fig. R30B**) o los de su forma fosforilada en tirosinas (**Fig. R30C**) en lisados totales (LT) o inmunoprecipitados (IP) obtenidos en condiciones de excitotoxicidad respecto a cultivos control mostró una disminución muy similar ($23\pm 8\%$ y $26\pm 17\%$, respectivamente, $n=5$). Una interpretación de estos resultados sería que la susceptibilidad de GluN2A al procesamiento es independiente de su estado de fosforilación en tirosinas que, sin embargo, entraría en conflicto con los resultados de la **Fig. R29B** mostrando menor procesamiento de la subunidad al inhibir las tirosina fosfatasa. Por tanto, la explicación más probable es que los procesos de defosforilación de tirosinas y de procesamiento de GluN2A estén estrechamente acoplados entre sí.

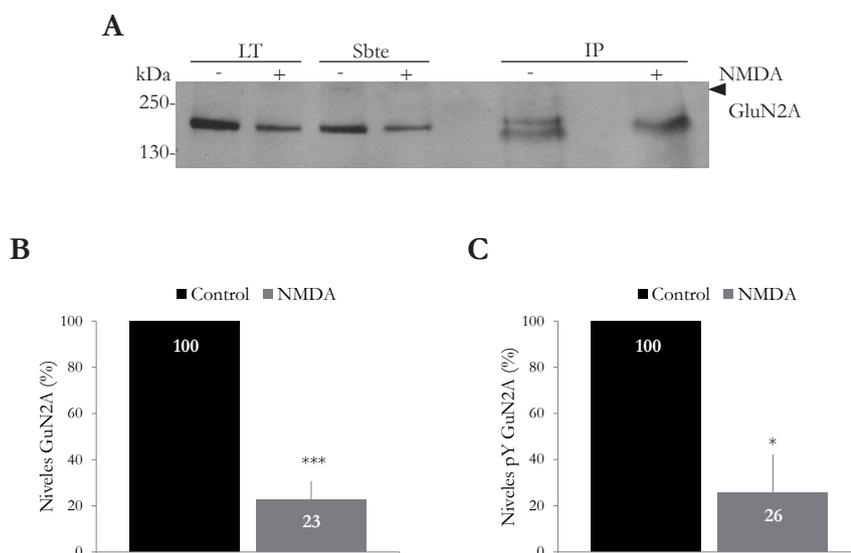


Figura R30. Análisis de los niveles de GluN2A fosforilada en tirosinas (pY GluN2A) en condiciones basales y excitotóxicas. A. Extractos proteicos procedentes de cultivos primarios neuronales mantenidos sin estimular o tratados con NMDA 20 μ M durante 4 h fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-pY. Posteriormente, los niveles de GluN2A presentes en los lisados totales (LT), las muestras inmunoprecipitadas (IP) y el sobrenadante obtenido tras la inmunoprecipitación (Sbte) fueron analizados mediante WB. **B.** Cuantificación de los niveles de GluN2A presentes en los lisados totales procedentes de cultivos control o estimulados durante 4 h con NMDA. **C.** Cuantificación de los niveles de pY GluN2A en las muestras inmunoprecipitadas procedentes de cultivos tratados de la manera descrita anteriormente. En ambos casos (B y C) se representan los valores medios \pm s.e.m. ($n=5$) expresados en porcentaje respecto a los obtenidos en los cultivos control, no estimulados con NMDA, a los que se les asigna un valor arbitrario del 100%. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la *t* de Student desapareada (* $p<0.05$, *** $p<0.001$).

Seguidamente, abordamos si el péptido TG2A₁₁₇₉ podría estar regulando el procesamiento de GluN2A modificando el estado de fosforilación de sus residuos Y1184 y/o Y1187. La hipótesis de trabajo era que el péptido podría ejercer su efecto neuroprotector inhibiendo específicamente la defosforilación de estos residuos de GluN2A, inducida por la activación de tirosina fosfatasas durante el proceso excitotóxico. El péptido ayudaría a preservar la subunidad en una forma fosforilada en la/s Y1184 y/o Y1187 que, según sugieren los resultados anteriores (**Fig. R29B**), podría ser más resistente al procesamiento por calpaína. En primer lugar, estudiamos posibles efectos del péptido en condiciones basales incubando los cultivos con TMyc o TG2A₁₁₇₉ durante 2, 4 y 6 h (**Fig. R31A**). El tratamiento producía un ligero cambio en la movilidad de GluN2A al tiempo más largo de tratamiento con TG2A₁₁₇₉, sugeriendo de un aumento en su nivel de

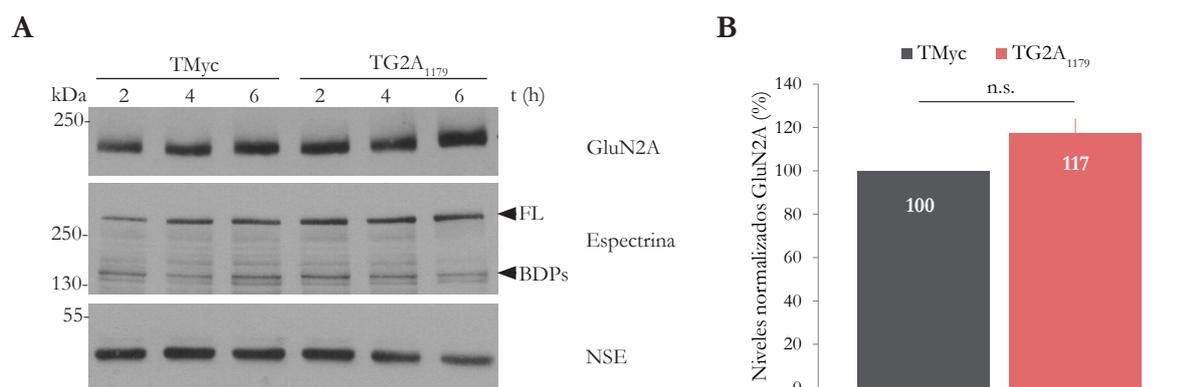


Figura R31. Efecto de los péptidos TMyc y TG2A₁₁₇₉ sobre la estabilidad basal y movilidad electroforética de GluN2A. **A.** Evaluación mediante WB de la estabilidad y movilidad de GluN2A en cultivos primarios de neuronas tratados durante 2, 4 ó 6 h con los péptidos TMyc o TG2A₁₁₇₉. **B.** Cuantificación densitométrica de los niveles de GluN2A normalizados respecto a la proteína NSE en cultivos neuronales tratados durante 6 h con los péptidos TMyc o TG2A₁₁₇₉. Los niveles de GluN2A en presencia de TG2A₁₁₇₉ se expresan en porcentaje respecto a los obtenidos con TMyc, a los que arbitrariamente se asigna el valor 100%. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la *t* de Student desapareada (n.s., no significativo).

fosforilación no observado con el péptido control. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de GluN2A al menos tras 6 h de tratamiento (**Fig. R31B**, $n=6$), aunque será interesante investigar tratamientos más prolongados. También investigamos si la fosforilación de TG2A₁₁₇₉ una vez dentro de las células era necesaria para su efecto neuroprotector. Por ello, diseñamos los péptidos TG2A₁₁₇₉ (Y1184F), TG2A₁₁₇₉ (Y1187F) y TG2A₁₁₇₉ (Y1184-7F), análogos a TG2A₁₁₇₉ pero en los que los residuos Y1184 y Y1187 fueron sustituidos por fenilalanina (**Fig. R32A**). Analizamos estos péptidos utilizando el modelo agudo de excitotoxicidad (**Fig. R10A**), encontrando un efecto neuroprotector muy similar al de TG2A₁₁₇₉ para todas las variantes (**Fig. R32B**, $n=6$). Los péptidos no fosforilables eran además capaces de interferir el procesamiento por calpaína de GluN2A (**Fig. R32C**). Estos resultados podrían deberse a que los residuos adyacentes a los de tirosina contribuyen al reconocimiento eficiente por las PTPs de sus sustratos (Zhang, 2002). Para profundizar en esta caracterización, a continuación realizamos un experimento preliminar en el que inhibimos la actividad de las tirosina quinasas con genisteína (10 μ M, 30 min) previamente al tratamiento con los péptidos TMyc o TG2A₁₁₇₉ (25 μ M, 1 h) y a la inducción del proceso de excitotoxicidad (20 μ M, 4 h) (**Fig. R32D**). En los cultivos preincubados con TMyc y tratados con genisteína observamos una mayor susceptibilidad de GluN2A al procesamiento respecto a los no tratados, confirmando resultados anteriores (**Fig. R29**). Sin embargo, el péptido TG2A₁₁₇₉ fue capaz todavía de interferir el procesamiento de la subunidad en condiciones en que no podía haber sufrido fosforilación intracelular. Por tanto, la fosforilación de TG2A₁₁₇₉

no parece ser necesaria para ejercer su efecto neuroprotector.

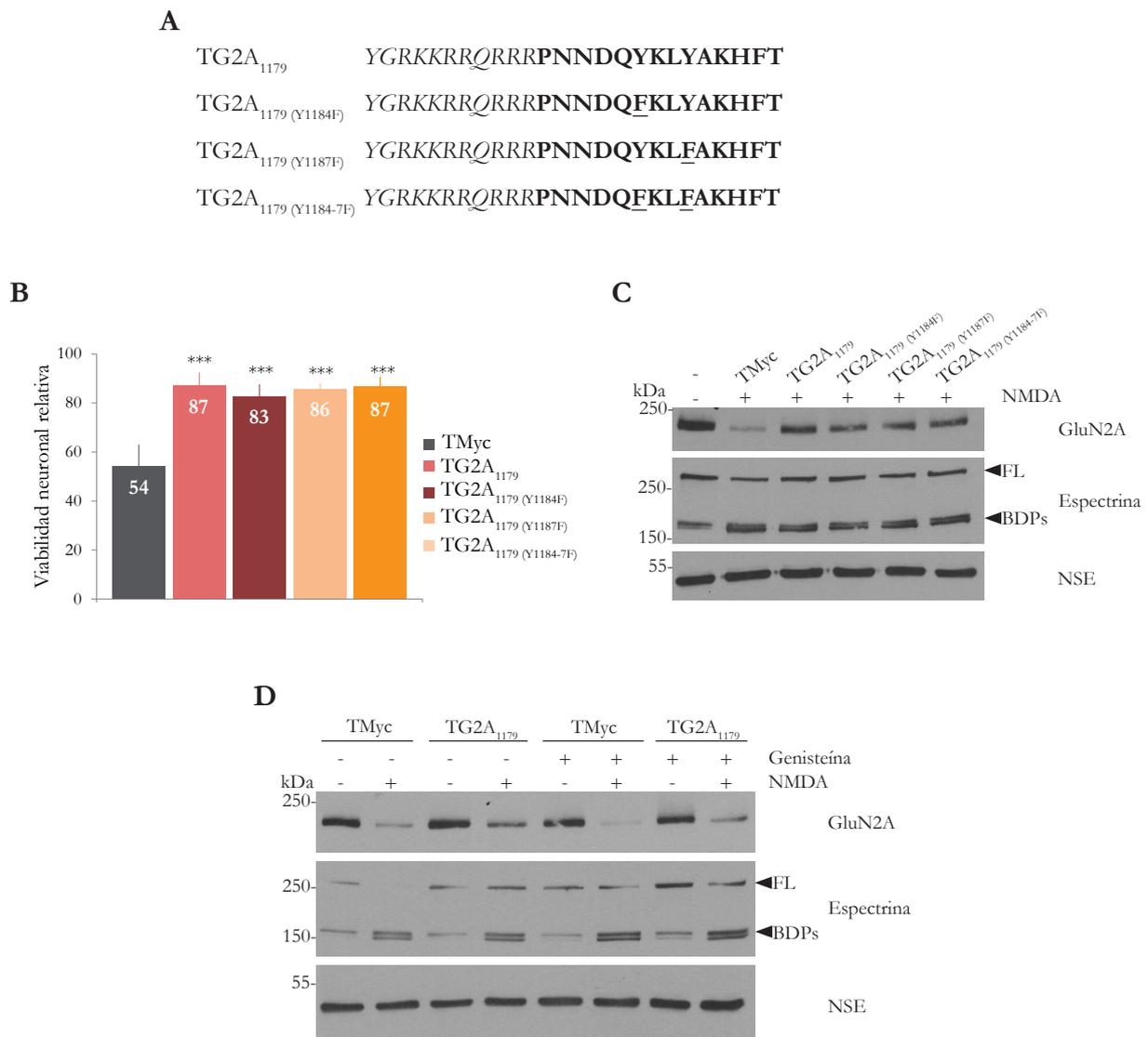


Figura R32. Análisis de un posible requerimiento de fosforilación del péptido TG2A₁₁₇₉ para ejercer sus efectos sobre la estabilidad de GluN2A y la supervivencia neuronal. **A.** Secuencia de los péptidos TG2A₁₁₇₉ y sus variantes TG2A₁₁₇₉ (Y1184F), TG2A₁₁₇₉ (Y1187F) y TG2A₁₁₇₉ (Y1184-7F) en la que se indica el dominio de transactivación de la proteína Tat (cursiva) así como la secuencia de la proteína GluN2A (negrita) y las sustituciones de los residuos de tirosina correspondientes por fenilalanina en cada caso (subrayado). **B.** Análisis mediante ensayo MTT de la supervivencia neuronal en presencia de los péptidos TMyc, TG2A₁₁₇₉, TG2A₁₁₇₉ (Y1184F), TG2A₁₁₇₉ (Y1187F) y TG2A₁₁₇₉ (Y1184-7F) (25 μ M) en el modelo agudo de excitotoxicidad. Los péptidos fueron incubados durante 1 h previamente al tratamiento con NMDA. Se representan valores de viabilidad medios \pm s.e.m. relativos a los obtenidos en cultivos control sin tratar con péptido ni NMDA (n=6). Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el modelo lineal generalizado (***) $p < 0.001$. **C.** Evaluación del procesamiento de GluN2A en cultivos sometidos a excitotoxicidad como anteriormente. **D.** Análisis del efecto de TG2A₁₁₇₉ en presencia del inhibidor de tirosina quinasas genisteína. Cultivos primarios neuronales fueron tratados con genisteína 10 μ M y tras 30 min incubados con TMyc o TG2A₁₁₇₉ durante 1 h previa al tratamiento con NMDA 20 μ M durante 4 h.

Por último, analizamos el efecto de TG2A₁₁₇₉ sobre el estado de fosforilación en tirosinas de GluN2A en condiciones basales y excitotóxicas. Realizamos experimentos de inmunoprecipitación con extractos de cultivos primarios incubados con TMyc o TG2A₁₁₇₉ (25 μ M, 1 h) y tratados posteriormente con NMDA durante 4 h (**Fig. R33B**). Para analizar el estado de fosforilación basal, los cultivos permanecieron 5 h con los péptidos en ausencia de NMDA (**Fig. R33A**). La cuantificación de tres experimentos independientes (**Fig. R33C**) mostró que, en condiciones basales, los niveles de fosforilación en tirosinas de la subunidad eran similares con ambos péptidos (100 \pm 53% y 99 \pm 36%, respectivamente para TMyc y TG2A₁₁₇₉). En

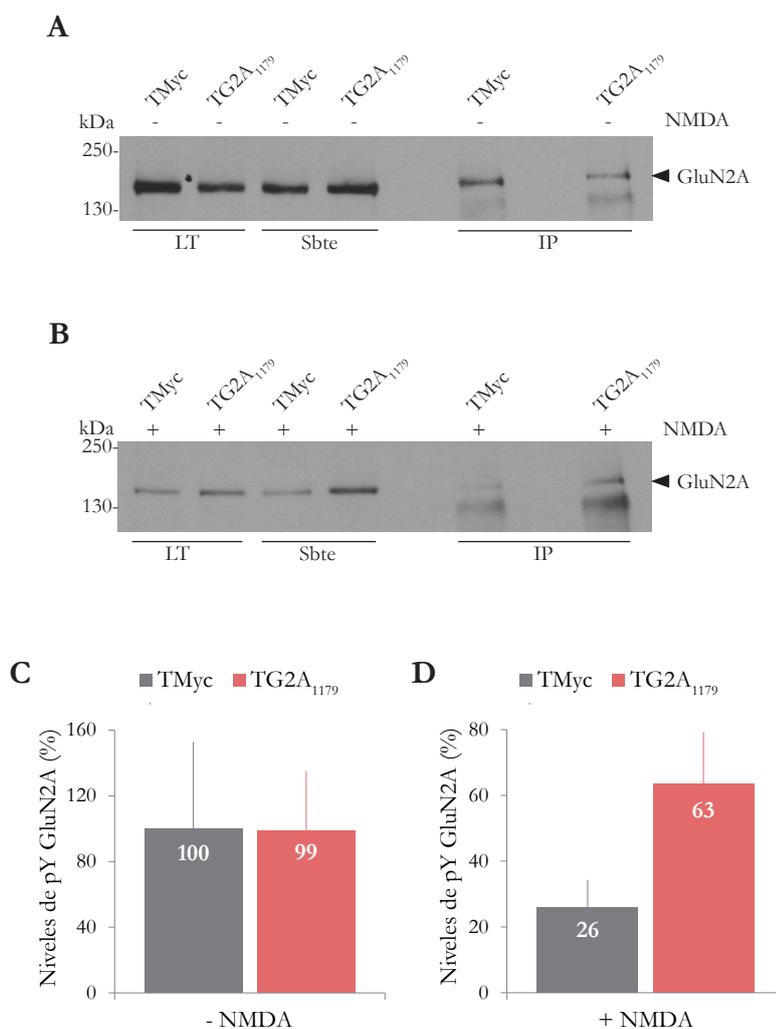


Figura R33. Análisis del efecto de TG2A₁₁₇₉ sobre los niveles de GluN2A fosforilada en tirosinas (pY GluN2A) en condiciones basales y excitotóxicas. **A.** Extractos proteicos procedentes de cultivos primarios neuronales tratados con TMyc o TG2A₁₁₇₉ durante 5 h fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-pY. Posteriormente, los niveles de GluN2A fueron analizados mediante WB en los lisados totales (LT), las muestras inmunoprecipitadas (IP) y el sobrenadante obtenido tras la inmunoprecipitación (Sbte). **B.** Extractos proteicos preincubados con TMyc o TG2A₁₁₇₉ durante 1 h y estimulados posteriormente con NMDA 20 μ M durante 4 h en presencia de los péptidos fueron sometidos a inmunoprecipitación y analizados como anteriormente. **C.** Cuantificación de los niveles de pY GluN2A en cultivos tratados con los péptidos TMyc o TG2A₁₁₇₉ durante 5 h. Se representan los valores medios \pm s.e.m. (n=3) como porcentaje en relación al valor medio obtenido en las muestras inmunoprecipitadas en presencia de TMyc. **D.** Cuantificación de los niveles de pY GluN2A en cultivos tratados con los péptidos TMyc o TG2A₁₁₇₉ y tratados posteriormente con NMDA. Los valores medios \pm s.e.m. (n=3) aparecen representados como porcentaje en relación al valor medio obtenido en las muestras inmunoprecipitadas con su péptido correspondiente pero no tratadas con NMDA. En todos los casos, los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la *t* de Student desapareada.

contraste, la incubación con TG2A₁₁₇₉ previa a la adición de NMDA previno notablemente la caída en los niveles de la proteína GluN2A fosforilada en tirosinas (**Fig. R33D**, $63 \pm 27\%$), a diferencia de TMyc, para el que se obtuvo un efecto similar al anteriormente observado en ausencia de péptido (**Fig. R30**). Sin embargo, probablemente debido a la variabilidad de este tipo de experimentos y al bajo número de repeticiones realizadas, la tendencia observada no llegó a ser estadísticamente significativa ($p=0.053$) por lo que será necesario aumentar la muestra experimental.

En conjunto, los resultados anteriores demuestran un efecto significativo de la fosforilación en tirosinas sobre la degradación de GluN2A en condiciones de excitotoxicidad que podría deberse al acoplamiento entre la defosforilación de determinados residuos de tirosina en la proteína y su procesamiento por calpaína. El péptido TG2A₁₁₇₉, capaz de ejercer su efecto neuroprotector sin necesidad de que sus propios residuos de

tirosina estén fosforilados, muestra una tendencia a mantener los niveles de GluN2A fosforilada en tirosinas en condiciones de excitotoxicidad. Por tanto, TG2A₁₁₇₉ podría estar interfiriendo específicamente la defosforilación de los residuos de GluN2A Y1184 y/o Y1187, que serían determinantes críticos para la eficiencia del reconocimiento y procesamiento por calpaína de su sustrato.

12. Evaluación del efecto neuroprotector del péptido TG2A₁₁₇₉ en un modelo de isquemia cerebral focal permanente

Una vez demostrada la capacidad neuroprotectora de TG2A₁₁₇₉ en procesos de excitotoxicidad *in vitro*, nuestro siguiente objetivo consistió en analizar su efecto *in vivo* utilizando el modelo de isquemia cerebral permanente. Los experimentos presentados a continuación fueron realizados en fases iniciales de esta Tesis y, en ellos, lesionamos un área de la corteza somatosensorial (coordenadas 0 AP, +3 ML) mediante la irradiación durante 15 min con un haz de fibra óptica de 2.25 mm de diámetro (**Fig. R34A**). En base a trabajos publicados usando CPPs similares en modelos de isquemia en rata (Aarts et al., 2002; Cui et al., 2007; Soriano et al., 2008; Bell et al., 2013), la dosis de péptidos TMyc y TG2A₁₁₇₉ utilizada fue de 3 nmol/g. Éstos fueron administrados por vía i.v. 5 min antes de la irradiación con la luz fría, tratando de aprovechar la rápida difusión de los péptidos (Davoli et al., 2014) para facilitar su presencia en el tejido cerebral previamente a la inducción de la lesión. Sin embargo, la tinción con TTC de secciones coronales de cerebro de animales sacrificados a las 24 h (**Fig. R34B**) no permitió demostrar diferencias significativas en el volumen del infarto entre los grupos analizados (**Fig. R34C**, n=5).

Para optimizar las condiciones del ensayo, en el segundo experimento tratamos de aumentar la estabilidad de los péptidos en el plasma modificando sus residuos terminales, como se indicó anteriormente. Previamente al estudio *in vivo*, comparamos el efecto de MTMyc y MTG2A₁₁₇₉ sobre la viabilidad neuronal respecto a los péptidos sin modificar. En condiciones basales, descartamos un efecto de estos péptidos tras su incubación durante 5 h en los cultivos neuronales (**Fig. R35A**, n=3). Además, MTG2A₁₁₇₉ era capaz de preservar la viabilidad neuronal en condiciones de excitotoxicidad de forma similar a lo demostrado anteriormente para TG2A₁₁₇₉ (**Fig. R35B**). Una vez confirmado el efecto neuroprotector de MTG2A₁₁₇₉ sobre la excitotoxicidad *in vitro*, abordamos su caracterización *in vivo*. Basándonos en resultados recientes demostrando que, a diferencia de rata, la dosis óptima del péptido Tat-NR2B9c en modelos de isquemia en ratón era de 10 nmol/g (Teves et al., 2016), en este experimento utilizamos dicha dosis de MTMyc y MTG2A₁₁₇₉. Modificaciones adicionales consistieron en la administración de los péptidos 10 min después del inicio del daño, siguiendo el esquema experimental utilizado anteriormente para MTP95₄₁₄ (**Fig. R15C**), y la lesión de un área dentro de la corteza motora (coordenadas +0.2 AP, +2 ML) con objeto de poder evaluar funcionalmente a los animales sometidos a isquemia. Como primera aproximación a la caracterización de la eficacia de MTG2A₁₁₇₉, analizamos los niveles de GluN2A en el tejido lesionado de la corteza ipsilateral y su zona contralateral equivalente en animales sacrificados a las 3 h de daño (**Fig. R35C**). Observamos que MTG2A₁₁₇₉ era capaz de interferir el procesamiento de GluN2A en la región infartada, que mantenía unos niveles ligeramente superiores a los obtenidos en los animales tratados con MTMyc. Adicionalmente, el análisis del volumen de infarto, visualizado mediante la tinción de las rodajas de cerebro con

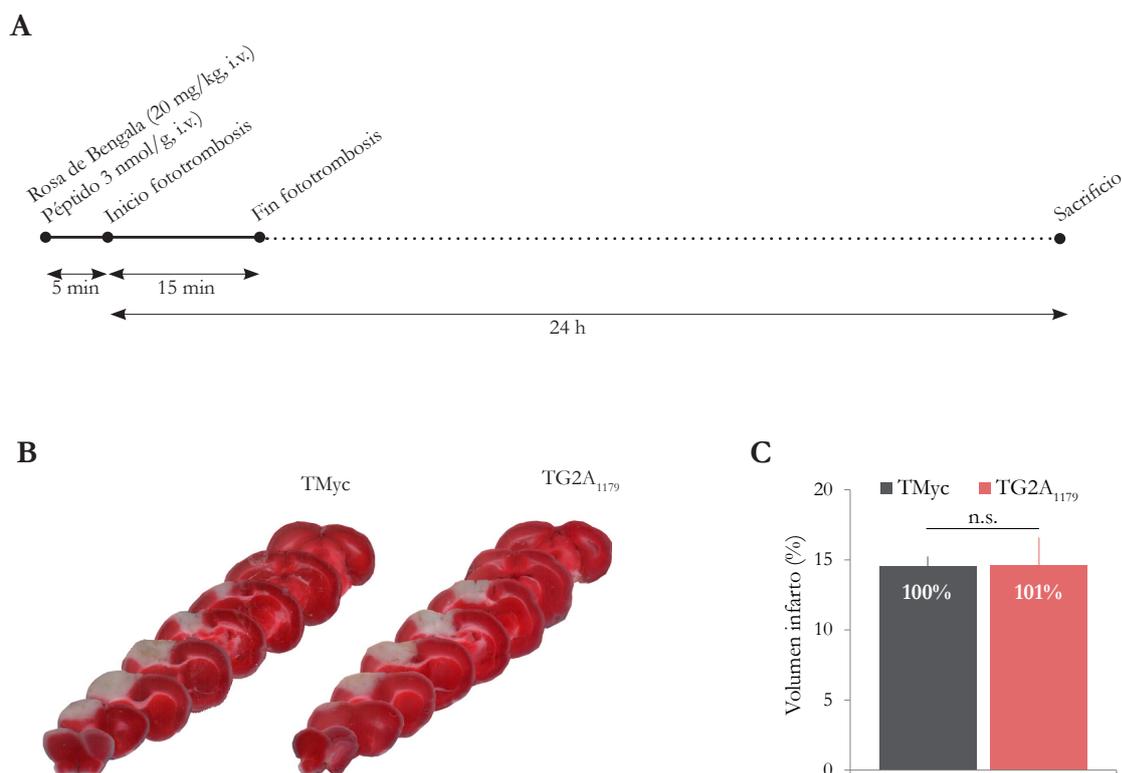


Figura R34. Análisis del efecto de TG2A₁₁₇₉ a concentración 3 nmol/g en un modelo de isquemia cerebral permanente. **A.** Esquema del protocolo de isquemia cerebral focal permanente utilizado. Ratones de 8 semanas fueron inyectados con el agente oxidante Rosa de Bengala (20 mg/kg) y tratados inmediatamente después con los péptidos TMyc y TG2A₁₁₇₉ a una dosis 3 nmol/g, en ambos casos mediante inyección i.v. (n=5 por grupo). Después de 5 min, se irradió la superficie de cráneo durante 15 min con un haz de luz fría (Ø 2.25 mm). Los animales fueron sacrificados 24 h después del inicio de la lesión. **B.** Rodajas coronales representativas de 1 mm de grosor teñidas con TTC, procedentes de los animales tratados con TMyc y TG2A₁₁₇₉ y sacrificados 24 h después del inicio del daño. **C.** Evaluación del volumen de infarto. Los datos se expresan en porcentaje respecto al total del hemisferio. Arbitrariamente se asignó un valor del 100% al promedio del volumen de infarto generado en los animales tratados con TMyc. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (n.s.) al comparar el tamaño del infarto en los animales tratados con TG2A₁₁₇₉ o TMyc utilizando el test de la *t* de Student desapareada (n=5/grupo).

TTC (**Fig. R35D**), mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con MTMyc y MTG2A₁₁₇₉ (**Fig. R35E**). El péptido MTG2A₁₁₇₉ fue capaz de reducir el volumen de infarto al $73 \pm 9\%$ respecto al obtenido en los animales inyectados con MTMyc, al que asignamos arbitrariamente el valor de 100% ($*p < 0.05$, n=17 para MTMyc, n=14 para MTG2A₁₁₇₉). Por último, investigamos si el efecto neuroprotector de MTG2A₁₁₇₉ se correlacionaba con una mejora en la coordinación motora de los animales. Para ello, utilizamos el test del equilibrio en barra o *beam walking*, en el que se contabiliza el número de resbalones de la pata trasera izquierda producidos como consecuencia de la lesión de la corteza motora del hemisferio derecho (**Fig. R35F**). Observamos que el tratamiento con el péptido MTG2A₁₁₇₉ disminuía al $72 \pm 8\%$ el número de resbalones respecto a los animales tratados con el péptido control, al que asignamos el valor de 100% ($*p < 0.05$, n MTMyc=16 y n MTG2A₁₁₇₉=14).

En conjunto, estos resultados demuestran que el péptido MTG2A₁₁₇₉ ejerce un efecto neuroprotector *in vivo* reduciendo de manera significativa el volumen del infarto en isquemia cerebral permanente y produciendo una mejora funcional. Además, estos datos también ponen de manifiesto el papel central de los NMDARs formados por subunidades GluN2A en la supervivencia neuronal y su potencial como diana terapéutica.

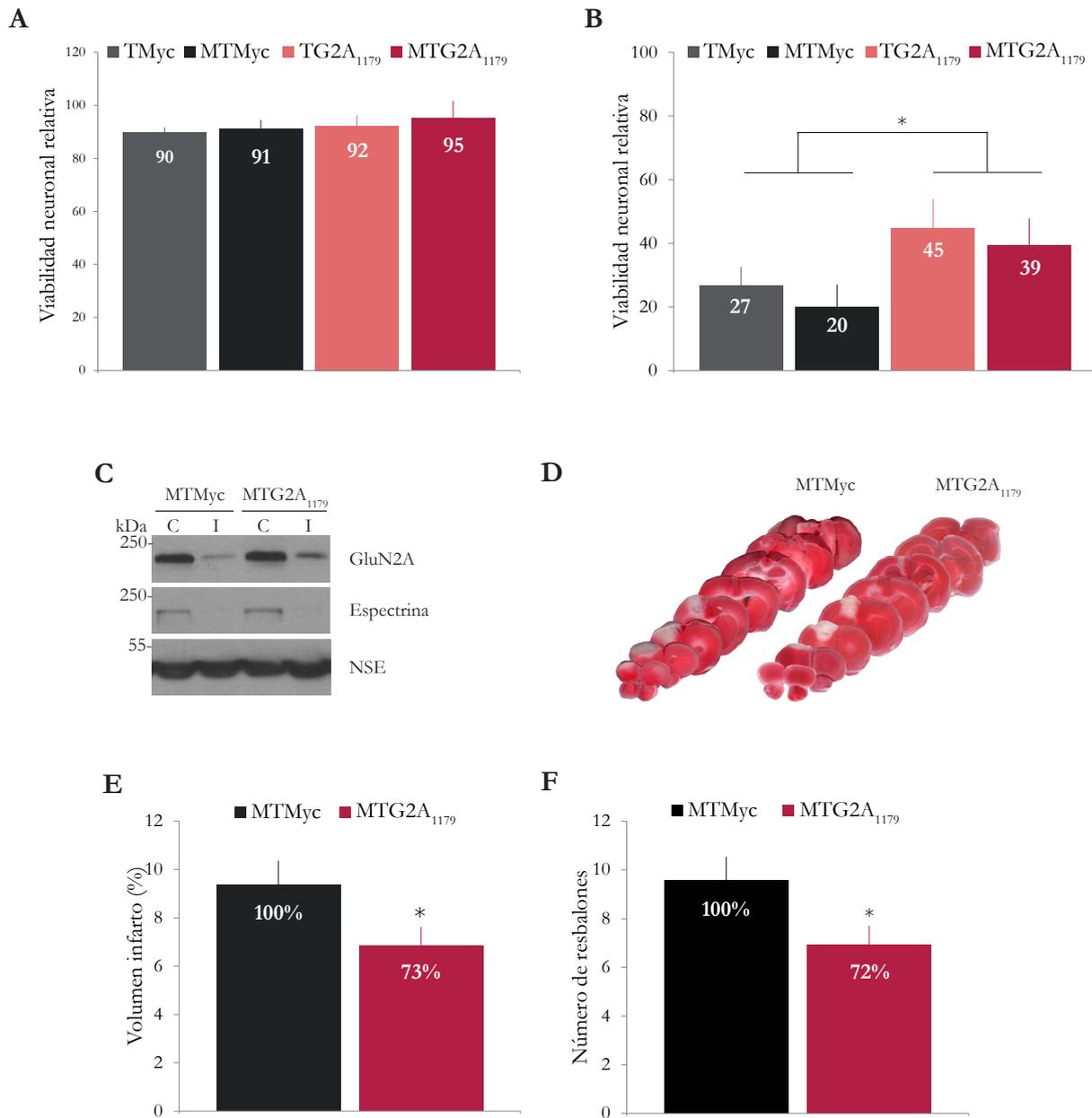


Figura R35. Análisis del efecto de TG2A₁₁₇₉ a concentración 10 nmol/g en un modelo de isquemia cerebral permanente. **A.** Análisis mediante ensayo MTT del efecto de los péptidos TMyc, TG2A₁₁₇₉ y sus variantes modificadas MTMyc y MTG2A₁₁₇₉ sobre la viabilidad neuronal basal. Los cultivos primarios fueron preincubados durante 5 h con los distintos péptidos a la concentración de 25 μ M (n=3). Los datos se analizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) no encontrándose diferencias significativas. **B.** Análisis mediante ensayo MTT del efecto protector del péptido MTG2A₁₁₇₉ en condiciones excitotóxicas. Los cultivos fueron pretratados con los péptidos TMyc, MTMyc, TG2A₁₁₇₉ y MTG2A₁₁₇₉ (25 μ M, 1h) y posteriormente estimulados con NMDA (20 μ M) durante 4 h (n=3). El estudio estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA; * p <0.05). **C.** Análisis preliminar por WB del efecto del péptido MTG2A₁₁₇₉ sobre los niveles de GluN2A en un animal sometido a isquemia cerebral como se indicó en la Fig. R15C, pero sacrificado 3 h tras la inducción del daño. Se comparan la región infartada del hemisferio ipsilateral (I) respecto a la zona equivalente en el hemisferio contralateral (C) en animales inyectados con MTMyc o MTG2A₁₁₇₉ (10 nmol/g), 10 min después del inicio del daño neuronal. **D.** Rodajas coronales representativas de cerebro de 1 mm de grosor teñidas con TTC, procedentes de animales tratados con MTMyc o MTG2A₁₁₇₉ y sacrificados 24 h después del inicio del daño. **E.** Evaluación del volumen de infarto 24 h después de la isquemia mediante tinción con TTC. Los datos se expresan en porcentaje respecto al total del hemisferio. Arbitrariamente se asignó un valor del 100% al promedio del volumen de infarto generado en los animales tratados con TMyc. El análisis estadístico se realizó mediante el test de la t de Student desapareada (* p <0.05, n=17 para MTMyc, n=14 para MTG2A₁₁₇₉). **F.** Evaluación de la coordinación motora y el balance a través del test del equilibrio en barra o *beam walking*. El test se realizó previamente al sacrificio a las 24 h después del inicio de la lesión, utilizando una barra de 1 m de longitud y 10 mm de anchura. Se contabilizaron el número de resbalones de la pata trasera izquierda debidos a la lesión en la corteza motora del hemisferio derecho en un tramo interno de 50 cm. Arbitrariamente se asignó un valor del 100% al número de resbalones en los animales tratados con MTMyc. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la t de Student desapareada (* p <0.05, n=16 para MTMyc, n=14 para MTG2A₁₁₇₉).

DISCUSIÓN

El trabajo presentado en esta Tesis profundiza en los mecanismos de regulación en excitotoxicidad e isquemia cerebral de dos proteínas clave para el correcto funcionamiento del SNC: la subunidad GluN2A del NMDAR, indispensable en la señalización prosupervivencia mediada por este receptor, y su proteína interaccionante PSD-95, crucial para la organización y estructura de la PSD. Los resultados obtenidos a través del desarrollo de péptidos neuroprotectores dirigidos a prevenir la regulación negativa de estas dos proteínas en excitotoxicidad señalan su importancia como dianas terapéuticas en isquemia cerebral y otras patologías con un componente excitotóxico.

1. Procesamiento de GluN2A y PSD-95 en un modelo de isquemia cerebral permanente

En este trabajo de Tesis, hemos caracterizado la regulación de la subunidad GluN2A del NMDAR así como de su proteína interaccionante PSD-95 en un modelo de isquemia cerebral permanente inducida por fototrombosis donde el proceso de excitotoxicidad ocurre *in vivo*. La proteólisis por calpaína de GluN2A da lugar a fragmentos C-terminales de tamaños comprendidos entre 74 y 15 kDa solamente estables hasta 2.5 h tras la inducción del daño y a un fragmento N-terminal de 115 kDa que presenta una alta estabilidad en el tejido infartado. Los resultados obtenidos confirman las observaciones anteriores de nuestro grupo demostrando el procesamiento de GluN2A y la formación de un fragmento N-terminal de 115 kDa en un modelo celular de excitotoxicidad así como en un modelo de isquemia cerebral transitoria (Gascon et al., 2008b). Además, ponen de manifiesto la formación de fragmentos de la subunidad de baja estabilidad que no habían podido identificarse previamente muy similares tanto *in vitro* como *in vivo*. Puesto que el dominio C-terminal de las subunidades GluN2 resulta crítico para la localización y función del NMDAR (Bolton et al., 2000), este procesamiento provoca el desacoplamiento de los NMDARs formados por subunidades GluN2A de complejos de señalización implicados en la supervivencia neuronal y contribuye así a la muerte neuronal.

Por otra parte, los resultados demuestran un procesamiento también muy temprano de PSD-95 en este modelo *in vivo* que da lugar a la aparición de fragmentos C-terminales de alrededor de 50, 45 y 35 kDa, muy estables incluso 24 h después de la isquemia. El trabajo anterior de nuestro laboratorio caracterizó el procesamiento por calpaína de PSD-95 *in vitro* y en un modelo de isquemia cerebral transitoria inducida por MCAO (Gascon et al., 2008b). Asimismo, determinó los sitios de procesamiento por calpaína en PSD-95 utilizando para ello la técnica de degradación de Edman, secuenciando los extremos N-terminales resultantes del procesamiento *in vitro* de la proteína por parte de la calpaína I purificada (Vidaurre, 2011). Así, se identificaron tres secuencias de procesamiento por la proteasa: en primer lugar la secuencia NSPPV en posición 33, cuyo procesamiento daría lugar a una variante de PSD-95 incapaz de anclarse a la membrana plasmática al carecer de los residuos de cisteína 3 y 5, cuya modificación por palmitoilación permite el anclaje así como su interacción con los canales iónicos dotados de ligandos PDZ (El-Husseini et al., 2000a; Topinka and Brecht, 1998). En segundo lugar, las secuencias TSYS y TDYP en posiciones 261 y 279, respectivamente, cuyo procesamiento daría lugar a fragmentos de un tamaño aproximado de 50 kDa y finalmente la secuencia SFTASL en posición 417, que generaría un fragmento de 35 kDa. Por tanto, el procesamiento de PSD-95 ocurre en al menos tres regiones y produce un fragmento conteniendo los PDZ1 y PDZ2, otro formado por el dominio PDZ3 y otro conteniendo las regiones SH3 y GK.

En esta Tesis hemos demostrado la formación *in vivo* de los fragmentos f50 y f35 descritos anteriormente y de fragmentos de alrededor de 60 (f60) y 45 (f45) kDa complementarios a los anteriores (detectables con un anticuerpo que reconoce una región N-terminal de PSD-95) y resultantes del procesamiento de dicha proteína en las posiciones 261-279 y 417. Sin embargo, la dificultad para detectar f60 tanto en el modelo celular como en el tejido infartado señala un procesamiento más eficiente de calpaína en la secuencia 261-279 respecto a la 417, provocando la ruptura de la proteína en dos grandes supramódulos: el formado por los PDZ1 y 2 y el compuesto por los dominios PDZ3, SH3 y GK (McCann et al., 2012; Pan et al., 2011). Debido a la alta estabilidad de los fragmentos f50, f45 y f35 de PSD-95 en el tejido isquémico, éstos podrían competir con la proteína en su forma completa por su unión a otras proteínas, desacoplándola así de su red de interacciones, por lo que será interesante evaluar en un futuro una posible contribución de los mismos a la muerte neuronal excitotóxica. En este sentido, es interesante resaltar que otros miembros de la familia de proteínas MAGUK experimentan procesamientos similares mediados por diferentes sistemas enzimáticos que generan fragmentos que participan en el mecanismo de apoptosis. Este es el caso, por ejemplo, de la proteína de andamiaje MAGI-1 que es procesada por caspasas generando fragmentos que cambian su localización subcelular y pueden participar en la apoptosis (Ivanova et al., 2007).

En conjunto estos resultados reflejan un mecanismo de regulación de PSD-95 y GluN2A muy similar al observado *in vitro* en el cerebro adulto en condiciones patológicas. Puede resultar interesante investigar si estos fragmentos fruto de su procesamiento mantienen su localización y las interacciones establecidas por estas proteínas en sus formas completas. Así por ejemplo, el supramódulo formado por los PDZ1 y PDZ2 de PSD-95, que interacciona con las subunidades GluN2B del NMDAR y la enzima nNOS (Christopherson et al., 1999; Sattler et al., 1999), queda excindido del resto de la proteína por acción de la calpaína y, puesto que nNOS y GluN2B también son sustratos de esta proteasa, puede que esta interacción persista o no por parte de los fragmentos de estas proteínas y ello tenga repercusión sobre la muerte neuronal. Por otra parte también sería interesante estudiar el estado de las interacciones del fragmento formado por el supramódulo SH3-GK tras el procesamiento por calpaína, ya que a él se unen proteínas de andamiaje, adaptadoras y de citoesqueleto que participan en procesos de remodelación sináptica y en la estabilidad de la PSD (Pak et al., 2001; Sturgill et al., 2009), por lo que el procesamiento en la posición 417 de PSD-95 y el desacoplamiento de las interacciones establecidas a través de estos dominios pueden generar una desestructuración de la PSD con repercusión sobre la función sináptica.

2. Regulación de PSD-95 en hipoglucemia

La excitotoxicidad es uno de los factores implicados en la muerte neuronal hipoglucémica (revisado en Languren et al., 2013) y, como se mencionó, diferentes estudios han mostrado que la administración de antagonistas de los receptores de glutamato de tipo NMDA y no NMDA y la eliminación de las aferencias corticales glutamatérgicas reduce la muerte neuronal en ratas hipoglucémicas (Butcher et al., 1987a; Butcher et al., 1987b; Nelligard and Wieloch, 1992; Sandberg et al., 1986; Wieloch, 1985). Además, la activación de la calpaína en esta circunstancia (Ferrand-Drake et al., 2003) podría provocar la regulación negativa de sus sustratos y contribuir a la muerte neuronal en esta patología. Por ello, decidimos analizar los niveles de PSD-95 en animales sometidos a hipoglucemia, observando que esta proteína sufre un procesamiento por

calpaína similar al observado en el modelo de isquemia cerebral permanente. Hemos analizado dos zonas susceptibles al daño hipoglucémico (Auer et al., 1984b), corteza parietal y estriado, en ratas sometidas a coma hipoglucémico durante tiempos cortos (7-12 min) y, puesto que el daño y degeneración neuronal inducido en el modelo de hipoglucemia utilizado es moderado y no genera un daño masivo en la zona afectada, hemos centrado nuestro estudio en la detección de los fragmentos f50, f35 y f45 de PSD-95 ya que la detección de cambios sobre los niveles de la proteína completa en este modelo resultaría más complejo. Hemos demostrado un aumento significativo de los fragmentos f50, f35 y f45 en la corteza parietal de las ratas hipoglucémicas respecto a los niveles de estos fragmentos en animales control y un aumento significativo solo del fragmento f50 en estriado. La detección de estos fragmentos en los individuos control, aunque en unos niveles inferiores a los observados tras la inducción de la hipoglucemia, podría deberse a cierta actividad basal de la calpaína o corresponder con la pequeña fracción de muerte neuronal que puede ocurrir de forma normal en el tejido vivo. En cualquier caso, observamos una fuerte asociación entre la formación de estos fragmentos de PSD-95 y el estado de coma hipoglucémico mucho más evidente en corteza parietal que en estriado. Este resultado es interesante, pues correlaciona con el número de neuronas en proceso de degeneración encontrado en estos tejidos tras el evento hipoglucémico. Así, se han detectado alrededor de 2000 células en proceso de neurodegeneración en la corteza parietal de ratas sometidas a coma hipoglucémico por un periodo de entre 3 a 7 min (Julio-Amilpas et al., 2015) y alrededor de tres veces menos en estriado (Langurén et al., datos no publicados).

Estos resultados muestran por tanto el procesamiento de PSD-95 en hipoglucemia, que da lugar a la detección de fragmentos de la proteína tras tiempos muy cortos de coma muy similares a los observados en isquemia cerebral. Este resultado confirma el procesamiento por calpaína de esta proteína de andamiaje en patologías donde la excitotoxicidad juega un papel primordial, tales como la isquemia cerebral o la hipoglucemia. Además, dada la importancia de esta proteína en los procesos de plasticidad y transmisión sináptica, consideramos de gran interés evaluar en el futuro la eficacia neuroprotectora del péptido TP95₄₁₄ desarrollado en este trabajo en esta patología, analizando su capacidad para prevenir la muerte neuronal en las zonas afectadas o de revertir las alteraciones cognitivas encontradas. A este respecto, sería interesante también evaluar los niveles de PSD-95 en otras regiones vulnerables al daño hipoglucémico como el hipocampo, cuyo daño se relaciona con un deterioro en el aprendizaje y la memoria (Suh et al., 2003; Alvarez et al., 2009).

3. Desarrollo de CPPs para interferir el procesamiento por calpaína de GluN2A y PSD-95 en el modelo de excitotoxicidad *in vitro*

La excitotoxicidad provoca la alteración de la función fisiológica de los NMDARs y el procesamiento de su proteína interaccionante PSD-95 puede agravar esta situación debido a su papel clave en el tráfico y *clustering* de los receptores contribuyendo al desarrollo de la muerte neuronal. Por ello, en este trabajo decidimos desarrollar CPPs dirigidos a interferir el procesamiento por calpaína de estas proteínas y evaluar su efecto neuroprotector.

3.1. Interferencia del procesamiento de PSD-95

La activación de calpaína regula la muerte neuronal y el uso de inhibidores farmacológicos para esta proteasa ha sido considerado como una posible estrategia de neuroprotección (Ray and Banik, 2003). Sin embargo, el requerimiento de esta proteasa para la función neuronal fisiológica hace que su inhibición no solo promueva la supervivencia neuronal, sino que también provoque déficits en la densidad de espinas, la ramificación dendrítica y la LTP (Amini et al., 2013). Por ello, el uso de CPPs que interfieran específicamente la actividad patológica de la calpaína sobre sustratos específicos ha emergido como alternativa a los inhibidores genéricos y se ha utilizado ya con éxito para bloquear, por ejemplo, el procesamiento del receptor metabotrópico de glutamato mGluR1 α (Xu et al., 2007) o de la proteína TRPC6 (Du et al., 2010). Con el objetivo de interferir de manera específica el procesamiento de PSD-95 y basándonos en esta estrategia, hemos diseñado CPPs basados en el dominio de transducción de la proteína Tat a la que hemos fusionado las secuencias de corte por calpaína en PSD-95 identificadas anteriormente. Diseñamos los péptidos TP95₂₉ (conteniendo la secuencia aminoacídica 29-42 de PSD-95), TP95₂₅₉ (259-284) y TP95₄₁₄ (414-427) y elegimos como control de nuestros experimentos un péptido que posee los aminoácidos 408-421 del FT c-Myc (TMyc), utilizado ya anteriormente por otros grupos (Tashev et al., 2009; Chiodi et al., 2014). Comprobamos que solamente el péptido TP95₄₁₄ previene el procesamiento de PSD-95 y que este efecto se correlaciona con su capacidad para aumentar la resistencia de las neuronas al daño excitotóxico *in vitro*. La falta de eficacia de los péptidos TP95₂₉ y TP95₂₅₉ ensayados podría deberse a la necesidad de una secuencia más o menos amplia a la utilizada en estos péptidos para el reconocimiento por calpaína como sustrato. Por otra parte, el péptido TP95₂₅₉ porta una secuencia de 37 aminoácidos, mayor a la de los otros dos péptidos TP95 (de 25 aa.), debido a que contiene los dos posibles sitios de corte identificados por secuenciación (aa. 261 y aa. 279) entre los PDZ2 y PDZ3, y puede que esta mayor longitud de la secuencia haya alterado la permeabilidad del péptido afectando a los resultados obtenidos. Por ello, será necesario optimizar el reconocimiento de calpaína mediante el desarrollo de nuevos péptidos TP95.

Por su parte, el péptido TP95₄₁₄ interfiere la acción proteolítica de calpaína entre los dominios PDZ3 y SH3-GK y preserva los niveles de la forma completa de la proteína disminuyendo la formación de f35 y de f50. Como mencionamos, la detección en mayor proporción de los fragmentos f50 y f45 respecto a f35 y f60 sugiere que el procesamiento de PSD-95 en la posición 417 es quizá menor y puede que esto facilite la interferencia del procesamiento en este punto, a diferencia de otros sitios con un procesamiento más activo. Además, el hecho de que la interferencia en una sola de las secuencias de procesamiento identificadas anteriormente permita mantener los niveles de la proteína completa, sugiere una jerarquía en los cortes que deberemos estudiar con más detalle en un futuro. De cualquier forma, el efecto neuroprotector de TP95₄₁₄ pone de manifiesto la importancia para la supervivencia neuronal de las interacciones y vías de señalización mediadas por el supramódulo SH3-GK que podrían estar quedando desacopladas en condiciones de sobreactivación patológica de los NMDARs. Como comentamos anteriormente, el supramódulo formado por estos dos dominios de PSD-95 interacciona con otras proteínas que participan en la remodelación sináptica (Pak et al., 2001) y en la estabilidad de la PSD (Sturgill et al., 2009), procesos que pueden resultar clave tras la isquemia cerebral. Además, se ha descrito que la fosforilación por Src del residuo Y523 de PSD-95 presente en esta región facilita la integración de la proteína Pyk2 al complejo de señalización de PSD-95, la activación

del complejo Pyk2/Src y la fosforilación subsiguiente de GluN2A en residuos de tirosina, la cual provoca la regulación positiva de la función del receptor y de la transmisión sináptica (Zhao et al., 2015) y que la proteína GKAP también interacciona con PSD-95 a través de estos dominios formando un complejo con ella y el NMDAR (Kim et al., 2007) mediante el cual regula la actividad del receptor (Yamada et al., 1999). Por estas razones, el péptido TP95₄₁₄ podría estar ejerciendo su efecto neuroprotector indirectamente a través del mantenimiento de interacciones críticas para la funcionalidad del NMDAR.

Además, hemos observado que la hiperfosforilación de PSD-95 mediante la inhibición de las serina/treonina fosfatasas PP1 y PP2A provoca una disminución de sus niveles tras 30 min de tratamiento que, sin embargo, vuelven a recuperarse tras 2 h de tratamiento con el inhibidor. Este resultado permite sugerir que los niveles de la proteína están altamente regulados en la célula y al detectarse una disminución en los mismos, se pone en marcha la síntesis de nueva proteína. Por otra parte, hemos detectado una mayor susceptibilidad de PSD-95 a ser procesada por calpaína al inhibir la defosforilación de los residuos de serina y treonina presentes en su secuencia y, puesto que la secuencia 414-427 de PSD-95 que porta este péptido contiene cinco residuos de serina y una treonina, hemos comenzado a estudiar si TP95₄₁₄ podría estar alterando el estado de fosforilación de PSD-95, modificando así su susceptibilidad al procesamiento por calpaína, proceso que ya ha sido descrito para otros sustratos (Lopez-Menendez et al., 2013; Wu et al., 2007).

Los resultados preliminares con TP95₄₁₄ permiten sugerir que este péptido es capaz de revertir, al menos en parte, tanto el efecto inestabilizante de la acumulación de formas fosforiladas en serinas y treoninas como el procesamiento por calpaína *in vitro* de la proteína hiperfosforilada en estos residuos, sugiriendo que el estado de fosforilación de los residuos de serina y/o treonina presentes en la secuencia del péptido TP95₄₁₄ (aa. 414-427) marca la susceptibilidad de la proteína a ser procesada por calpaína. Esta hipótesis supondría que, tras la entrada de TP95₄₁₄ en las células, éste competiría con las moléculas de PSD-95 endógenas por la/s quinasa/s que fosforila/n el/los residuo/s de serina y/o treonina de la secuencia 414-427 y, al reducirse el estado de fosforilación de PSD-95 en estos residuos clave, disminuiría su susceptibilidad a ser procesada por calpaína (**Fig. D1**). Será muy interesante en un futuro confirmar esta hipótesis y conocer cuál de los cinco residuos de serina o el residuo de treonina de la secuencia 414-427 es crítico en este proceso de regulación así como conocer la quinasa implicada en este proceso. Aun así, estos resultados han de ser analizados con cautela, ya que el tratamiento con el inhibidor de serina/treonina fosfatasas AO sobre los cultivos primarios neuronales constituye un modelo de neurodegeneración, utilizado en los estudios de AD (Yoon et al., 2006; Lopez-Menendez et al., 2013). El tratamiento con AO podría producir una pequeña activación de calpaína, no demostrable por la formación de BDPs en nuestros experimentos, que tuviese una gran eficacia sobre el procesamiento de ciertos sustratos como PSD-95 y que descartaría un efecto específico de la fosforilación en serinas y/o treoninas sobre la proteína. En este sentido, recientemente se ha descrito que la calpaína I forma un complejo con la proteína HSP90 situado en el complejo multiproteico del NMDAR en el que la proteasa mantiene su capacidad catalítica incluso en ausencia de Ca²⁺ (Averna et al., 2015) y PSD-95 se encuentra en dicho complejo (revisado en Wang et al., 2013; Baudry and Bi, 2016), por lo que puede ser que esté sometida a una regulación por calpaína en condiciones no excitotóxicas. Por ello, será interesante en el futuro profundizar en los mecanismos que regulan la estabilidad de esta proteína tanto en condiciones basales como excitotóxicas.

3.2. Interferencia del procesamiento de GluN2A

En base a los resultados previos que apuntaban a los sitios 943-944 y 1187-1188 como dianas de procesamiento por calpaína de GluN2A (Bi et al., 1998b; González-Camacho, 2012) y siguiendo la misma estrategia utilizada para los péptidos TP95, desarrollamos los péptidos TG2A₉₃₆ (aa. 936-946) y TG2A₁₁₇₉ (aa. 1179-1192). Comprobamos que TG2A₁₁₇₉ y en menor medida TG2A₉₃₆ son neuroprotectores *in vitro*, indicando una relevancia mayor de la secuencia 1179-1192 que 936-946 en el procesamiento de la subunidad. Sin embargo, ambos péptidos interfieren el procesamiento por calpaína de la subunidad, observando que este efecto se asocia a una mejora en la supervivencia neuronal en condiciones de excitotoxicidad.

Un mecanismo que precede a la muerte neuronal consiste en la disminución de los niveles de fosforilación de CREB en las neuronas sometidas a excitotoxicidad (Walton and Dragunow, 2000). Hemos comprobado que el péptido TG2A₁₁₇₉ es capaz de mantener la fosforilación de CREB en condiciones excitotóxicas atenuando así el silenciamiento de este FT provocado por el incremento en los niveles intracelulares de Ca²⁺ (Hardingham et al., 2002). Así, la administración de TG2A₁₁₇₉ permite mantener la actividad promotora de la transcripción de CREB en condiciones excitotóxicas sobre sus genes diana implicados en la supervivencia neuronal tales como TrkB (Deogracias et al., 2004), BDNF (Tao et al., 1998), GluN1 (Lau et al., 2004) y GluN2A (Desai et al., 2002) por lo que, a través de este efecto TG2A₁₁₇₉ es capaz de mantener la activación por glutamato de los NMDARs y de TrkB por BDNF, dando lugar así a una neuroprotección a largo plazo (Lee et al., 2005).

Estos resultados junto con la significativa disminución del efecto neuroprotector del péptido al utilizar el inhibidor KG-501 indican que la actividad de este FT es necesaria para la neuroprotección mediada por TG2A₁₁₇₉ pero, sin embargo, no podemos descartar la participación de otras vías estrechamente relacionadas con la supervivencia neuronal que operen dando lugar al efecto neuroprotector observado puesto que, a pesar de que el efecto neuroprotector es menor, no es suprimido por completo. Además, los resultados obtenidos con el inhibidor STO-609 y UO126 no nos permiten elucidar qué quinasa está fosforilando a CREB posibilitando así el mantenimiento de la actividad de este FT. Se ha descrito que la fosforilación de CREB está mediada por la acción rápida de la vía de la quinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina o a través de la vía más lenta y de más larga duración ERK1/2 (Wu et al., 2001; Hardingham et al., 2001). En este sentido, los resultados obtenidos muestran que la inhibición de CamKK con el compuesto STO-609 o de las quinasas MEK-1/2 produce una disminución no significativa del efecto protector de TG2A₁₁₇₉ mostrando la participación de ambas vías. En cualquier caso, el péptido TG2A₁₁₇₉ tiene un efecto similar al observado en otros péptidos Tat desarrollados como Tat-NR2B9c (Bell et al., 2013) o Tat-K (Gamir-Morralla et al., 2015) señalando una vez más la importancia de preservar la función transcripcional de CREB, una respuesta neuroprotectora que se ha observado en las neuronas del área de penumbra y que podría verse implementada por la acción de estos péptidos (Sugiura et al., 2004).

Adicionalmente, el tratamiento con TG2A₁₁₇₉ mantiene la actividad promotora del FT MEF2, cuya actividad media también la supervivencia neuronal (Gaudilliere et al., 2002), mejorando así la capacidad neuroprotectora del péptido. Estos resultados indican que el mantenimiento de la señalización trófica glutamatérgica resulta crítico para el efecto neuroprotector mediado por TG2A₁₁₇₉. Además, este péptido parece provocar una menor activación de la proteasa calpaína que puede verse reflejada en una mejora de la estabili-

dad de otras proteínas relacionadas con la supervivencia neuronal cuyos niveles o actividad se ven reducidos en excitotoxicidad como por ejemplo AKT (Luo et al., 2003).

El papel de GluN2A en el daño neuronal tras la isquemia es controvertido ya que esta subunidad puede estar participando inicialmente en la inducción de procesos de muerte a través de la sobrecarga de Ca^{2+} a través del receptor y, posteriormente y a diferencia de GluN2B, en mecanismos de supervivencia que involucran las interacciones con vías de supervivencia neuronal a través de su CTD (revisado en Sun et al., 2017; Martel et al., 2012). Sin embargo, los resultados obtenidos con TG2A₁₁₇₉ indican una fuerte asociación de las subunidades GluN2A de localización tanto sináptica como extrasináptica con la señalización pro supervivencia llevada a cabo por el NMDAR (Lai et al., 2011) puesto que hemos demostrado como el mantenimiento de los niveles de esta subunidad en condiciones excitotóxicas, lejos de agravar el daño, provoca una mejora en la resistencia de las neuronas al daño excitotóxico. Resultados similares se han observado mediante la aplicación de inhibidores frente a GluN2A que han mostrado un efecto potenciador de la muerte neuronal en modelos animales de isquemia (Liu et al., 2007; Chen et al., 2008a). Sin embargo, los resultados obtenidos con los antagonistas de GluN2A en la reversión del daño excitotóxico (Ferrer-Montiel et al., 1998) o la disminución del volumen infartado en ratones *knock-out* para GluN2A (Morikawa et al., 1998) son aparentemente contradictorios y pueden ser debidos a que el efecto total de GluN2A sobre la supervivencia neuronal puede depender de las diferencias en la expresión temporal de la subunidad, la intensidad en su activación, el ratio GluN2A/GluN2B en las diferentes regiones cerebrales o la dosis de administración de los antagonistas de GluN2A. En este sentido, el destino final de las neuronas en excitotoxicidad podría estar definido por el balance total entre la señalización mediada por las subunidades GluN2B, asociadas a través de su CTD con moléculas promuerte (Sun et al., 2015), y por las subunidades GluN2A, cuya activación, a pesar de contribuir a la entrada de Ca^{2+} a través del NMDAR, potenciaría los mecanismos de supervivencia (Hoque et al., 2016).

3.2.1. Mecanismo de regulación del procesamiento por calpaína de GluN2A en excitotoxicidad

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo de acción del péptido TG2A₁₁₇₉ hemos explorado la posibilidad de que los residuos Y1184 y/o Y1187 de GluN2A que porta el mismo regulen el procesamiento de la subunidad en excitotoxicidad en vez de constituir un sitio de corte por la proteasa como pensamos anteriormente (González-Camacho, 2012). De manera contraria a lo observado para PSD-95, hemos demostrado que la fosforilación en tirosinas de la subunidad confiere una menor susceptibilidad al procesamiento y que la defosforilación en tirosinas parece ser un mecanismo que precede al subsiguiente procesamiento de GluN2A en excitotoxicidad. En este sentido, la preincubación de los cultivos primarios neuronales con el péptido TG2A₁₁₇₉ parece mantener en mayor medida los niveles de fosforilación en tirosinas de la subunidad, sugiriendo un papel clave de los residuos Y1184 y/o Y1187 en la estabilidad de la proteína en condiciones excitotóxicas, cuyo estado fosforilado previene el procesamiento de la subunidad. Una explicación del mecanismo de acción del péptido sería que las fosfatasa encargadas de defosforilar los residuos Y1184 y/o Y1187 de GluN2A en excitotoxicidad reconocieran la secuencia TG2A₁₁₇₉ a pesar de que estos residuos no estén fosforilados en el péptido, reduciendo así la defosforilación de el/los residuo/s de tirosina 1184

y/o 1187 de GluN2A, y disminuyendo así su procesamiento posterior por calpaína (**Fig. D1**). Esto podría ocurrir ya que se ha descrito que los residuos adyacentes al residuo de tirosina contribuyen al eficiente reconocimiento de las PTPs por sus sustratos (Zhang, 2002).

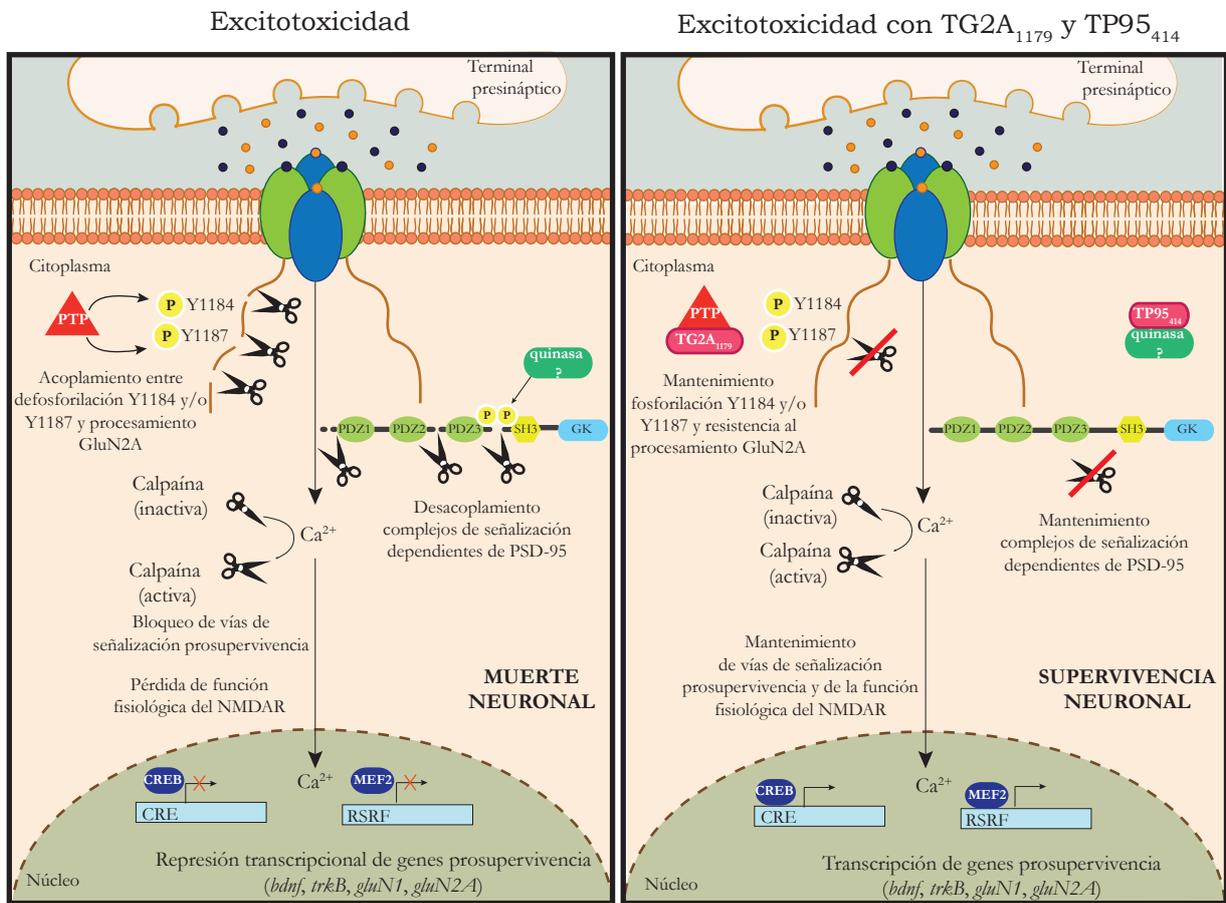


Figura D1. Modelo de acción de los péptidos TG2A₁₁₇₉ y TP95₄₁₄ en excitotoxicidad. La presencia del péptido TG2A₁₁₇₉ mejora la supervivencia neuronal en condiciones excitotóxicas mediante el mantenimiento de los niveles de subunidad GluN2A y de la transcripción de genes pro-supervivencia mediada por los factores de transcripción CREB y MEF2, tales como *bdnf*, *trkB*, *gluN1* y *gluN2A*. El péptido TG2A₁₁₇₉ puede estar ejerciendo este efecto neuroprotector a través de la inhibición de la PTP implicada en la defosforilación de los residuos Y1184 y/o Y1187, críticos en la susceptibilidad al corte por calpaína de la subunidad. Por su parte, el péptido TP95₄₁₄ confiere una mayor resistencia a la muerte neuronal en excitotoxicidad a través de la interferencia del procesamiento de PSD-95 en la posición 417. Este efecto puede estar mediado por el secuestro por parte de TP95₄₁₄ de la quinasa responsable de fosforilar el/los residuo/s de serina y/o treonina presentes en la secuencia 414-427 de PSD-95, ya que su estado fosforilado confiere una mayor susceptibilidad al procesamiento de la proteína.

El papel del estado de fosforilación de las subunidades GluN2 sobre su susceptibilidad al procesamiento por calpaína ha sido objeto de estudio anteriormente y se ha sugerido la existencia de fosforilaciones con efectos contrapuestos sobre la susceptibilidad al procesamiento por calpaína de GluN2A. Así, se ha descrito que la fosforilación en tirosinas mediada por Src protege a GluN2A del procesamiento por calpaína, mientras que la fosforilación por Fyn tendría el efecto contrario y promovería dicho procesamiento (Bi et al., 2000; Rong et al., 2001). Nuestros resultados apuntan a que la fosforilación de los residuos Y1184 y/o Y1187 resulta clave para interferir el procesamiento de la subunidad y puede que su defosforilación provoque la defosforilación posterior de otros residuos de tirosina presentes en el extremo C-terminal de la subunidad y su procesamiento. Sin embargo, una diferencia entre los resultados obtenidos por Bi y colaboradores (2000) y los nuestros es que, mientras que su investigación reporta un mantenimiento de los niveles de fosfotirosina en GluN2A en presencia de calpaína, nosotros hemos observado una caída en los mismos

en excitotoxicidad. Esta discrepancia puede deberse a que sus resultados son obtenidos a partir de extractos de membranas sinápticas tratadas con calpaína I *in vitro* mientras que los nuestros proceden de extractos proteicos de cultivos primarios neuronales tratados con NMDA, donde durante el tratamiento pueden activarse PTPs que al defosforilar la subunidad disminuyan los niveles de fosforilación en tirosinas de la misma.

Estos resultados junto a la existencia de un gran número de residuos de tirosina en la secuencia C-terminal de GluN2A potencialmente fosforilables, hacen que la regulación del procesamiento de GluN2A a través de este mecanismo sea compleja. Así, la fosforilación de residuos de tirosina en diferentes posiciones puede tener un efecto estabilizante o desestabilizante y el efecto final sobre la estabilidad de la proteína puede estar determinado por el balance entre ambos tipos de fosforilaciones. Sin embargo, los resultados obtenidos con el péptido TG2A₁₁₇₉ muestran un papel determinante de los residuos Y1184 y/o 1187, ya que su fosforilación interfiere el mecanismo de defosforilación en tirosinas de la subunidad en condiciones excitotóxicas y disminuye la susceptibilidad de la subunidad al procesamiento por calpaína. Dada la relevancia de estos residuos será interesante estudiar en un futuro qué quinasa y fosfatasa están implicadas en este mecanismo de regulación y si son ambos residuos de tirosina o solo uno de ellos los implicados en dicha regulación. Recientemente se ha demostrado que PSD-95 interacciona con la PTP STEP₆₁ en la PSD y la desestabiliza mediante ubiquitinación y degradación por el proteasoma (Won et al., 2016). Una posible hipótesis que explique los resultados obtenidos es que el procesamiento de PSD-95 en condiciones excitotóxicas establezca la expresión de STEP en la PSD y ésta actúe defosforilando GluN2A e induciendo así su procesamiento por calpaína. Esto podría ocurrir pues se ha descrito que STEP es también reclutada por los receptores asociados a proteína G, incluyendo el receptor muscarínico de acetilcolina M1 e impide el incremento de la función de los NMDARs compuestos por subunidades GluN2A mediada por Src (Tian et al., 2016). Entre las posibles quinasas implicadas en la fosforilación de estos residuos críticos, las Src PTKs son evidentes candidatas ya que se ha descrito su función reguladora sobre la actividad de los receptores a través de la fosforilación de las subunidades tanto GluN2A como GluN2B (Ali and Salter, 2001) y la formación de complejos con el NMDAR a través de PSD-95 (Kalia et al., 2006). Así, la regulación del NMDAR por mecanismos de fosforilación en tirosinas tiene una gran importancia desde el punto de vista fisiológico y se ha descrito que la disminución en las corrientes del receptor está relacionada con una disminución en el número de receptores funcionales y esto a su vez está estrechamente relacionado con mecanismos de defosforilación de tirosinas (Vissel et al., 2001) y con la internalización de los receptores (Valbuena and Lerma, 2016). Por ello, puede ser interesante analizar en un futuro si el péptido TG2A₁₁₇₉ es capaz de regular la expresión en superficie de las subunidades GluN2A a través del mantenimiento de la fosforilación de los residuos Y1184 y/o Y1187.

Es interesante señalar que tras la isquemia cerebral se ha descrito un rápido aumento en la fosforilación en tirosinas de GluN2A y en menor medida también en las subunidades GluN2B (Zhang et al., 1997) provocado por un reclutamiento de SFKs a la PSD (Cheung et al., 2000) que podría contribuir a las alteraciones en la función del receptor en estas condiciones patológicas. En este sentido, recientemente se ha descrito que tras la isquemia ocurre un aumento muy significativo de la fosforilación de los residuos 1184 y 1187 de GluN2A (Zhang et al., 2013a). Una posible explicación es que en condiciones excitotóxicas la célula intente contrarrestar la pérdida de NMDARs inmediatamente tras la isquemia a través del mantenimiento de la acti-

vidad de los receptores aún funcionales implicados en supervivencia neuronal y ello se refleje en un aumento en la fosforilación de residuos críticos de tirosinas en la subunidad GluN2A. Sin embargo, este mecanismo de sobreactivación de los NMDARs en las fases tempranas de la isquemia puede que, lejos de proteger a las neuronas del daño, lo exacerbe. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que GluN2A puede exhibir funciones bifásicas en las células del área de penumbra similares a las de PSD-95, desarrollando un efecto inicial deletéreo durante la fase de daño y un efecto beneficioso más tarde, durante la fase de recuperación, a través de la restauración de NMDARs funcionales.

4. Evaluación de la eficacia neuroprotectora de TG2A₁₁₇₉ y TP95₄₁₄ en isquemia cerebral

El desarrollo de herramientas de neuroprotección específicamente dirigidas a dianas alteradas como consecuencia de una patología tiene gran interés para la neurofarmacología clínica. Por ello, tras los resultados obtenidos *in vitro* con TP95₄₁₄ y TG2A₁₁₇₉ era importante evaluar su eficacia terapéutica en un modelo animal de isquemia cerebral donde la excitotoxicidad ocurre *in vivo*. Para ello utilizamos el modelo de isquemia permanente inducida por fototrombosis en el que previamente caracterizamos la regulación negativa de GluN2A y PSD-95 y donde observamos una progresión del daño, indicando que es posible la neuroprotección. A pesar de que este modelo presenta algunas diferencias con el ACV isquémico humano como, por ejemplo, el desarrollo simultáneo de edema citotóxico y vascular con rápida ruptura de la BHE (Carmichael, 2005) distinto al edema principalmente citotóxico generado en humanos (Scalzo et al., 2015) o la existencia de un área de penumbra reducida (Labat-gest and Tomasi, 2013; Qian et al., 2016), presenta también grandes ventajas que hacen muy atractivo su uso en el campo de la investigación de la isquemia. Se trata de un modelo relativamente simple, que no requiere largas cirugías ni craneotomía, evitando así cambios artefactuales debidos a dicho procedimiento (revisado en Dirnagl, 2010). De manera similar a lo que ocurre tras la oclusión de una arteria en un infarto cerebral humano, en este modelo ocurre agregación plaquetaria y formación de un coágulo que interrumpe el flujo sanguíneo en la zona irradiada (Dietrich et al., 1987), dando lugar a patrones histológicos similares a los encontrados en los infartos humanos (Pevsner et al., 2001). Además, la posibilidad de seleccionar mediante coordenadas estereotáxicas la región específica de la corteza cerebral en donde generar la lesión isquémica combinado con una alta reproducibilidad y una muy baja mortalidad lo convierten en un modelo muy adecuado para estudiar los mecanismos de reparación y la recuperación funcional a largo plazo mediante la utilización de diferentes tests neurológicos (Diederich et al., 2012; Frauenknecht et al., 2016; Baskin et al., 2003; Lee et al., 2007).

En este modelo, la administración de la variante estabilizada del péptido TP95₄₁₄, MTP95₄₁₄, 10 minutos después del inicio de la lesión no es capaz de reducir el volumen de infarto en los animales. Pese a que la ausencia de reperfusión, la pequeña zona de penumbra y la rápida progresión del daño puedan dificultar la neuroprotección en este modelo, la utilización del mismo ha servido anteriormente para demostrar el efecto neuroprotector de otros compuestos desarrollados (Reichenbach et al., 2016; Ahn et al., 2016; Parada et al., 2014; Egea et al., 2014; Bix et al., 2013; Lorrio et al., 2013). Por ello, los resultados obtenidos nos llevan a cuestionar la estabilidad de MTP95₄₁₄ así como la dosis empleada, factores críticos en estos experimentos. Puesto que comprobamos que las modificaciones en los extremos terminales de TP95₄₁₄ no

afectan a la capacidad neuroprotectora *in vitro*, descartamos que estas modificaciones hayan causado el efecto observado. Sin embargo, puede que este péptido sea inestable en el plasma incluso con las modificaciones realizadas en su secuencia, por lo que será necesario estudiar su estabilidad así como la dosis óptima de administración, evaluando la necesidad de aplicar más de una dosis en los animales. En este sentido, otros péptidos desarrollados en nuestro laboratorio frente a otras dianas en isquemia han mostrado un efecto neuroprotector dependiente de la dosis, por lo que es necesario continuar trabajando para evaluar su efecto a otras dosis. Otro aspecto importante que puede condicionar los resultados obtenidos puede ser el momento de administración del péptido, debido a la implicación de PSD-95 en mecanismos de señalización prosupervivencia y muerte. Una posible explicación a los resultados obtenidos es que la regulación negativa de PSD-95 sea necesaria en estadios tempranos tras el daño isquémico, debido a su participación en cascadas de señalización muerte ya que, por ejemplo, PSD-95 permite el acoplamiento entre la sobreactivación patológica de los NMDARs y la activación de la enzima nNOS, con la consecuente neurotoxicidad asociada a la producción de NO. Así, puede que la estabilización de PSD-95 a través del péptido MTP95₄₁₄ potencie este acoplamiento, y favorezca el procesamiento por calpaína de nNOS y su cambio de localización desde la membrana plasmática al citosol, favoreciendo así la neurotoxicidad en isquemia (Averna et al., 2009). Por ello, puede que una administración más tardía del péptido TP95₄₁₄ permita preservar la función fisiológica de PSD-95 cuando la recuperación funcional se haya puesto en marcha y se requiera de su participación en la remodelación y plasticidad sinápticas. Sin embargo, esta hipótesis no explica el efecto observado en el modelo celular, donde la aplicación de TP95₄₁₄ antes del estímulo excitotóxico confiere una mayor resistencia a las neuronas frente al daño. Este efecto puede ser debido a la sincronía de los eventos beneficiosos y no beneficiosos en los que participa PSD-95 dentro de los cultivos primarios neuronales. Así, estos resultados señalan la complejidad de los eventos moleculares que caracterizan la respuesta del tejido cerebral a la isquemia y señalan la necesidad de profundizar en el estudio de los efectos del procesamiento de PSD-95 en excitotoxicidad e isquemia cerebral. En este sentido, y a pesar de los prometedores resultados que se han obtenido mediante la inhibición de las interacciones del complejo NMDAR-PSD-95-nNOS (Aarts et al., 2002; Bach et al., 2012; Zhou et al., 2010; Mo et al., 2016), existe una gran controversia acerca del papel de PSD-95 en isquemia, ya que esta proteína de andamiaje está también asociada a mecanismos potencialmente neuroprotectores (Russwurm et al., 2001). Además, el trabajo reciente de Kleinschitz y colaboradores (2016) señala la ineficacia de los inhibidores de PSD-95 para el tratamiento de la isquemia en roedores, apuntando a que solo la inhibición de nNOS y no la alteración de la interacción PSD-95-nNOS es capaz de reducir el volumen infartado. Por todo ello, es necesario continuar investigando el papel de PSD-95 en isquemia, ya que ello nos permitirá maximizar la neuroprotección sin interferir en los mecanismos de recuperación endógena.

Por otra parte, los experimentos realizados inicialmente con el péptido TG2A₁₁₇₉ a la dosis 3 nmol/g no mostraron ningún efecto protector y nos hicieron cuestionar la accesibilidad de estos péptidos al tejido cerebral y su estabilidad en el plasma una vez administrados. Por ello, confirmamos su llegada al parénquima cerebral 30 min más tarde de su administración mediante inyección intravenosa de un CPP marcado con biotina, análogo a los utilizados en este trabajo (datos no mostrados). Además, realizamos una serie de modificaciones en los residuos terminales de TG2A₁₁₇₉ así como del péptido control (iguales a las del péptido

MTP95₄₁₄ desarrollado posteriormente), con el objetivo de mejorar la estabilidad de estas moléculas frente a la degradación (Matsumoto et al., 2009; Stromstedt et al., 2009). Basándonos en el trabajo de Teves y colaboradores (2016) aumentamos la dosis de TG2A₁₁₇₉ a 10 nmol/g y decidimos administrarlo 10 min después de la inducción de la lesión, ya que el mecanismo de excitotoxicidad puesto en marcha tras la isquemia podría facilitar la entrada del péptido a las células (Vaslin et al., 2009). La reducción en el volumen del infarto de los animales tratados con MTG2A₁₁₇₉ de esta forma muestra un efecto neuroprotector dosis dependiente y señala la importancia de la estabilidad del péptido y del momento de administración tras el evento isquémico. Es importante señalar además que estos experimentos han contado con un buen control interno con el péptido TMyC, por lo que queda demostrado que la neuroprotección observada es debida a la secuencia 1179-1192 de GluN2A y no a un efecto inespecífico por parte de la secuencia Tat, rica en residuos de arginina. Este aspecto es importante ya que se ha cuestionado el mecanismo de acción de este tipo de CPPs, asociando su capacidad neuroprotectora a las secuencias ricas en arginina que portan (Meloni et al., 2015).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, consideramos testar en un futuro el efecto de la administración más tardía del péptido, ya que la posibilidad de aumentar la ventana terapéutica actual para el tratamiento de la isquemia sería de gran interés. Además, la evaluación funcional de los animales mediante el test del equilibrio en barra demuestra una clara relación entre la disminución del volumen del tejido cerebral infartado y la reversión del deterioro funcional. Se ha descrito que la subunidad GluN2A está implicada en la muerte neuronal excitotóxica que ocurre tempranamente al producirse la sobreactivación del NMDAR pero que el mantenimiento de la funcionalidad de los receptores que contienen esta subunidad resulta crítica para la recuperación posterior (Sun et al., 2017). Los resultados obtenidos parecen confirmar estas investigaciones ya que el péptido TG2A₁₁₇₉ rescata a las neuronas del área de penumbra de la muerte neuronal secundaria inducida por las neuronas del núcleo del infarto, indicando el papel central de las subunidades GluN2A del NMDAR en supervivencia y su interés como diana terapéutica. Sería muy interesante poder evaluar en el futuro el posible efecto neuroprotector de este péptido en otros modelos de daño neuronal donde la excitotoxicidad juegue un papel clave, como por ejemplo, en hipoglucemia o en enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, de cara a mejorar y refinar la eficacia de este péptido, deberemos estudiar mejor sus características en cuanto a permeabilidad a la membrana, afinidad a su diana, especificidad y estabilidad en el plasma. Otro aspecto que resultaría muy interesante sería combinar este péptido con otros péptidos neuroprotectores para promover las vías de señalización pro-supervivencia y evitar la señalización promuerte simultáneamente, lo cual eventualmente podría generar un efecto sinérgico muy positivo para el tratamiento de la isquemia cerebral y otras patologías con un componente excitotóxico.

CONCLUSIONES

1. En un modelo de isquemia cerebral permanente se produce muy tempranamente la rotura de la BBB y la activación en el tejido infartado de la calpaína, que procesa a la proteína de andamiaje PSD-95 en las secuencias intradominio anteriormente establecidas en modelos de excitotoxicidad *in vitro*. El procesamiento de la secuencia 261-279 es más eficiente que el del aminoácido 417.
2. En un modelo de daño neuronal producido por hipoglucemia, la excitotoxicidad y la consecuente activación de la calpaína en neuronas susceptibles de la corteza parietal y el estriado generan un procesamiento parcial de PSD-95 con un patrón análogo al observado en isquemia cerebral y eficacia dependiente de la intensidad del daño.
3. El péptido TP95₄₁₄ es capaz de prevenir la degradación proteolítica de PSD-95 e interferir las alteraciones morfológicas que preceden a la muerte neuronal, mejorando así la viabilidad neuronal en condiciones de excitotoxicidad *in vitro* inducida de manera aguda o crónica.
4. En un modelo de isquemia cerebral permanente, la subunidad GluN2A del NMDAR sufre un procesamiento complejo en el tejido infartado de su región intracelular que, de forma similar a lo observado en el modelo de excitotoxicidad *in vitro*, da lugar a un fragmento N-terminal muy estable y diversos fragmentos C-terminales transitoriamente estables.
5. Las secuencias 942-944 y 1184-1187 de GluN2A son críticas para su procesamiento por calpaína. Los péptidos TG2A₉₃₆ y TG2A₁₁₇₉, portadores respectivamente de estas secuencias, previenen el procesamiento de esta subunidad en excitotoxicidad *in vitro*, efecto que se correlaciona con su capacidad para conferir mayor resistencia al daño excitotóxico.
6. El péptido TG2A₁₁₇₉ ayuda a mantener los niveles de pCREB, cuya actividad parece ser crítica para el desarrollo de su papel neuroprotector en condiciones de excitotoxicidad, aunque no se descarta la participación de vías adicionales de señalización como las de MAPK/ERK, CamKK o PI3K.
7. El péptido TG2A₁₁₇₉ mantiene la transcripción dependiente de los factores CREB y MEF2 en condiciones de excitotoxicidad, permitiendo la expresión sostenida de diferentes proteínas prosupervivencia, como las subunidades del NMDAR o el receptor TrkB y su ligando BDNF, que desarrollan en conjunto un papel clave en el mantenimiento de la fisiología neuronal y de las vías de señalización prosupervivencia.
8. El estado de fosforilación en tirosinas de GluN2A regula su susceptibilidad a ser procesada por calpaína en condiciones de excitotoxicidad, existiendo una relación estrecha entre un bajo nivel de fosforilación y el procesamiento de la subunidad.
9. El péptido TG2A₁₁₇₉ muestra una tendencia a mantener los niveles de GluN2A fosforilada en tirosinas en condiciones de excitotoxicidad, sugiriendo que su mecanismo de acción consiste en la interferencia

específica de la defosforilación de los residuos Y1184 y/o Y1187 de GluN2A que, de ocurrir, resultaría crítica para el reconocimiento y procesamiento eficiente por calpaína de su sustrato.

10. El péptido MTG2A₁₁₇₉ ejerce un efecto neuroprotector *in vivo* que reduce significativamente el volumen del infarto en isquemia cerebral permanente y produce una recuperación funcional, indicando el papel central de los NMDARs formados por subunidades GluN2A en la supervivencia neuronal y su potencial como diana terapéutica.

BIBLIOGRAFÍA

Aarts, M., Liu, Y., Liu, L., Besshoh, S., Arundine, M., Gurd, J. W., Wang, Y. T., Salter, M. W. & Tymianski, M. 2002. Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. *Science*, 298, 846-50.

Ahn, S. M., Kim, H. N., Kim, Y. R., Choi, Y. W., Kim, C. M., Shin, H. K. & Choi, B. T. 2016. Emodin from *Polygonum multiflorum* ameliorates oxidative toxicity in HT22 cells and deficits in photothrombotic ischemia. *J Ethnopharmacol*, 188, 13-20.

Alberts, A. S., Montminy, M., Shenolikar, S. & Feramisco, J. R. 1994. Expression of a peptide inhibitor of protein phosphatase 1 increases phosphorylation and activity of CREB in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 14, 4398-407.

Ali, D. W. & Salter, M. W. 2001. NMDA receptor regulation by Src kinase signalling in excitatory synaptic transmission and plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, 11, 336-42.

Alvarez, E. O., Beauquis, J., Revsin, Y., Banzan, A. M., Roig, P., De Nicola, A. F. & Saravia, F. 2009. Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 1 diabetes. *Behav Brain Res*, 198, 224-30.

Amini, M., Ma, C. L., Farazifard, R., Zhu, G., Zhang, Y., Vanderluit, J., Zoltewicz, J. S., Hage, F., Savitt, J. M., Lagace, D. C., Slack, R. S., Beique, J. C., Baudry, M., Greer, P. A., Bergeron, R. & Park, D. S. 2013. Conditional disruption of calpain in the CNS alters dendrite morphology, impairs LTP, and promotes neuronal survival following injury. *J Neurosci*, 33, 5773-84.

Ankarcrona, M., Dypbukt, J. M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S. A. & Nicotera, P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 15, 961-73.

Astrup, J., Siesjo, B. K. & Symon, L. 1981. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*, 12, 723-5.

Auer, R. N., Olsson, Y. & Siesjo, B. K. 1984a. Hypoglycemic brain injury in the rat. Correlation of density of brain damage with the EEG isoelectric time: a quantitative study. *Diabetes*, 33, 1090-8.

Auer, R. N., Wieloch, T., Olsson, Y. & Siesjo, B. K. 1984b. The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathol*, 64, 177-91.

Autry, A. E., Adachi, M., Nosyreva, E., Na, E. S., Los, M. F., Cheng, P. F., Kavalali, E. T. & Monteggia, L. M. 2011. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature*, 475, 91-5.

Averna, M., Pellegrini, M., Cervetto, C., Pedrazzi, M., Bavestrello, M., De Tullio, R., Salamino, F., Pontremoli, S. & Melloni, E. 2015. Physiological Roles of Calpain 1 Associated to Multiprotein NMDA Receptor Complex. *PLoS One*, 10, e0139750.

Averna, M., Stifanese, R., De Tullio, R., Beccaria, F., Salamino, F., Pontremoli, S. & Melloni, E. 2009. Calpain-mediated activation of NO synthase in human neuroblastoma SK-N-BE cells. *J Neurochem*, 110, 412-21.

Averna, M., Stifanese, R., De Tullio, R., Salamino, F., Pontremoli, S. & Melloni, E. 2008. In vivo degradation of nitric oxide synthase (NOS) and heat shock protein 90 (HSP90) by calpain is modulated by the formation of a NOS-HSP90 heterocomplex. *FEBS J*, 275, 2501-11.

Bach, A., Clausen, B. H., Moller, M., Vestergaard, B., Chi, C. N., Round, A., Sorensen, P. L., Nissen, K. B., Kastrup, J. S., Gajhede, M., Jemth, P., Kristensen, A. S., Lundstrom, P., Lambertsen, K. L. & Stromgaard, K. 2012. A high-affinity, dimeric inhibitor of PSD-95 bivalently interacts with PDZ1-2 and protects against ischemic brain damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 3317-22.

Bai, G., Zhuang, Z., Liu, A., Chai, Y. & Hoffman, P. W. 2003. The role of the RE1 element in activation of the NR1 promoter during neuronal differentiation. *J Neurochem*, 86, 992-1005.

Bano, D., Young, K. W., Guerin, C. J., Lefevre, R., Rothwell, N. J., Naldini, L., Rizzuto, R., Carafoli, E. & Nicotera, P. 2005. Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell*, 120, 275-85.

Baretino, D., Pombo, P. M., Espliguero, G. & Rodriguez-Pena, A. 1999. The mouse neurotrophin receptor *trkB* gene is transcribed from two different promoters. *Biochim Biophys Acta*, 1446, 24-34.

Bartlett, T. E., Bannister, N. J., Collett, V. J., Dargan, S. L., Massey, P. V., Bortolotto, Z. A., Fitzjohn, S. M., Bashir, Z. I., Collingridge, G. L. & Lodge, D. 2007. Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus. *Neuropharmacology*, 52, 60-70.

Bartlett, T. E. & Wang, Y. T. 2013. The intersections of NMDAR-dependent synaptic plasticity and cell survival. *Neuropharmacology*, 74, 59-68.

Baskin, Y. K., Dietrich, W. D. & Green, E. J. 2003. Two effective behavioral tasks for evaluating sensorimotor dysfunction following traumatic brain injury in mice. *J Neurosci Methods*, 129, 87-93.

Bassell, G. J. & Warren, S. T. 2008. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron*, 60, 201-14.

Baudry, M. & Bi, X. 2016. Calpain-1 and Calpain-2: The Yin and Yang of Synaptic Plasticity and Neurodegeneration. *Trends Neurosci*, 39, 235-45.

Baxter, P. S., Bell, K. F., Hasel, P., Kaindl, A. M., Fricker, M., Thomson, D., Cregan, S. P., Gillingwater, T. H. & Hardingham, G. E. 2015. Synaptic NMDA receptor activity is coupled to the transcriptional control of the glutathione system. *Nat Commun*, 6, 6761.

Beal, M. F. 1998. Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann Neurol*, 44, S110-4.

Beckman, J. S. & Koppenol, W. H. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271, C1424-37.

Bell, K. F., Bent, R. J., Meese-Tamuri, S., Ali, A., Forder, J. P. & Aarts, M. M. 2013. Calmodulin Kinase IV-dependent CREB activation is required for neuroprotection via NMDA receptor-PSD95 disruption. *J Neurochem*.

Bhattacharyya, S., Biou, V., Xu, W., Schluter, O. & Malenka, R. C. 2009. A critical role for PSD-95/AKAP interactions in endocytosis of synaptic AMPA receptors. *Nat Neurosci*, 12, 172-81.

Bi, R., Rong, Y., Bernard, A., Khrestchatsky, M. & Baudry, M. 2000. Src-mediated tyrosine phosphorylation of NR2 subunits of N-methyl-D-aspartate receptors protects from calpain-mediated truncation of their C-terminal domains. *J Biol Chem*, 275, 26477-83.

Bi, X., Chen, J. & Baudry, M. 1998a. Calpain-mediated proteolysis of GluR1 subunits in organotypic hippocampal cultures following kainic acid treatment. *Brain Res*, 781, 355-7.

Bi, X., Rong, Y., Chen, J., Dang, S., Wang, Z. & Baudry, M. 1998b. Calpain-mediated regulation of NMDA receptor structure and function. *Brain Res*, 790, 245-53.

Bix, G. J., Gowing, E. K. & Clarkson, A. N. 2013. Perlecan domain V is neuroprotective and affords functional improvement in a photothrombotic stroke model in young and aged mice. *Transl Stroke Res*, 4, 515-23.

Bolton, M. M., Blanpied, T. A. & Ehlers, M. D. 2000. Localization and stabilization of ionotropic glutamate receptors at synapses. *Cell Mol Life Sci*, 57, 1517-25.

Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M. & Hayashi, Y. 2014. Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*, 82, 444-59.

Boulanger, L. M., Lombroso, P. J., Raghunathan, A., Dusing, M. J., Wahle, P. & Naegele, J. R. 1995. Cellular and molecular characterization of a brain-enriched protein tyrosine phosphatase. *J Neurosci*, 15, 1532-44.

Braeuninger, S. & Kleinschnitz, C. 2009. Rodent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Exp Transl Stroke Med*, 1, 8.

Braithwaite, S. P., Paul, S., Nairn, A. C. & Lombroso, P. J. 2006. Synaptic plasticity: one STEP at a time. *Trends Neurosci*, 29, 452-8.

Butcher, S. P., Jacobson, I., Sandberg, M., Hagberg, H. & Hamberger, A. 1987a. 2-Amino-5-phospho-

novalerate attenuates the severe hypoglycemia-induced loss of perforant path-evoked field potentials in the rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 76, 296-300.

Butcher, S. P., Sandberg, M., Hagberg, H. & Hamberger, A. 1987b. Cellular origins of endogenous amino acids released into the extracellular fluid of the rat striatum during severe insulin-induced hypoglycemia. *J Neurochem*, 48, 722-8.

Caccamo, A., Maldonado, M. A., Bokov, A. F., Majumder, S. & Oddo, S. 2010. CBP gene transfer increases BDNF levels and ameliorates learning and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 22687-92.

Campbell, R. L. & Davies, P. L. 2012. Structure-function relationships in calpains. *Biochem J*, 447, 335-51.

Carmichael, S. T. 2005. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx*, 2, 396-409.

Carroll, M. F., Burge, M. R. & Schade, D. S. 2003. Severe hypoglycemia in adults. *Rev Endocr Metab Disord*, 4, 149-57.

Collingridge, G. 1987. Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. *Nature*, 330, 604-5.

Cook, D. J., Teves, L. & Tymianski, M. 2012. Treatment of stroke with a PSD-95 inhibitor in the gyrencephalic primate brain. *Nature*, 483, 213-7.

Cryer, P. E. 2004. Diverse causes of hypoglycemia-associated autonomic failure in diabetes. *N Engl J Med*, 350, 2272-9.

Cui, H., Hayashi, A., Sun, H. S., Belmares, M. P., Cobey, C., Phan, T., Schweizer, J., Salter, M. W., Wang, Y. T., Tasker, R. A., Garman, D., Rabinowitz, J., Lu, P. S. & Tymianski, M. 2007. PDZ protein interactions underlying NMDA receptor-mediated excitotoxicity and neuroprotection by PSD-95 inhibitors. *J Neurosci*, 27, 9901-15.

Cull-Candy, S. G. & Leszkiewicz, D. N. 2004. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE*, 2004, re16.

Curcio, M., Salazar, I. L., Mele, M., Canzoniero, L. M. & Duarte, C. B. 2016. Calpains and neuronal damage in the ischemic brain: The swiss knife in synaptic injury. *Prog Neurobiol*, 143, 1-35.

Chang, N., El-Hayek, Y. H., Gomez, E. & Wan, Q. 2007. Phosphatase PTEN in neuronal injury and brain disorders. *Trends Neurosci*, 30, 581-6.

Chen, M., Lu, T. J., Chen, X. J., Zhou, Y., Chen, Q., Feng, X. Y., Xu, L., Duan, W. H. & Xiong, Z. Q.

2008a. Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance. *Stroke*, 39, 3042-8.

Chen, X., Levy, J. M., Hou, A., Winters, C., Azzam, R., Sousa, A. A., Leapman, R. D., Nicoll, R. A. & Reese, T. S. 2015. PSD-95 family MAGUKs are essential for anchoring AMPA and NMDA receptor complexes at the postsynaptic density. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, E6983-92.

Chen, X., Winters, C., Azzam, R., Li, X., Galbraith, J. A., Leapman, R. D. & Reese, T. S. 2008b. Organization of the core structure of the postsynaptic density. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 4453-8.

Cheng, M. C., Lu, C. L., Luu, S. U., Tsai, H. M., Hsu, S. H., Chen, T. T. & Chen, C. H. 2010. Genetic and functional analysis of the DLG4 gene encoding the post-synaptic density protein 95 in schizophrenia. *PLoS One*, 5, e15107.

Cheung, H. H., Takagi, N., Teves, L., Logan, R., Wallace, M. C. & Gurd, J. W. 2000. Altered association of protein tyrosine kinases with postsynaptic densities after transient cerebral ischemia in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20, 505-12.

Chiodi, V., Mallozzi, C., Ferrante, A., Chen, J. F., Lombroso, P. J., Di Stasi, A. M., Popoli, P. & Domenici, M. R. 2014. Cocaine-induced changes of synaptic transmission in the striatum are modulated by adenosine A2A receptors and involve the tyrosine phosphatase STEP. *Neuropsychopharmacology*, 39, 569-78.

Choi, D. W. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1, 623-34.

Choi, D. W., Maulucci-Gedde, M. & Kriegstein, A. R. 1987. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci*, 7, 357-68.

Choi, D. W. & Rothman, S. M. 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci*, 13, 171-82.

Choquet, D. & Triller, A. 2013. The dynamic synapse. *Neuron*, 80, 691-703.

Christopherson, K. S., Hillier, B. J., Lim, W. A. & Brecht, D. S. 1999. PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem*, 274, 27467-73.

Davoli, E., Scip, A., Cecchi, M., Cimini, S., Carra, A., Salmona, M. & Borsello, T. 2014. Determination of tissue levels of a neuroprotectant drug: the cell permeable JNK inhibitor peptide. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 70, 55-61.

Deb, I., Manhas, N., Poddar, R., Rajagopal, S., Allan, A. M., Lombroso, P. J., Rosenberg, G. A., Candeliario-Jalil, E. & Paul, S. 2013. Neuroprotective role of a brain-enriched tyrosine phosphatase, STEP, in focal cerebral ischemia. *J Neurosci*, 33, 17814-26.

Del Zoppo, G. J., Poeck, K., Pessin, M. S., Wolpert, S. M., Furlan, A. J., Ferbert, A., Alberts, M. J., Zivin, J. A., Wechsler, L., Busse, O. & Et Al. 1992. Recombinant tissue plasminogen activator in acute thrombotic and embolic stroke. *Ann Neurol*, 32, 78-86.

Delint-Ramirez, I., Fernandez, E., Bayes, A., Kicsi, E., Komiyama, N. H. & Grant, S. G. 2010. In vivo composition of NMDA receptor signaling complexes differs between membrane subdomains and is modulated by PSD-95 and PSD-93. *J Neurosci*, 30, 8162-70.

Deogracias, R., Espliguero, G., Iglesias, T. & Rodriguez-Pena, A. 2004. Expression of the neurotrophin receptor trkB is regulated by the cAMP/CREB pathway in neurons. *Mol Cell Neurosci*, 26, 470-80.

Desai, A., Turetsky, D., Vasudevan, K. & Buonanno, A. 2002. Analysis of transcriptional regulatory sequences of the N-methyl-D-aspartate receptor 2A subunit gene in cultured cortical neurons and transgenic mice. *J Biol Chem*, 277, 46374-84.

Dick, O. & Bading, H. 2010. Synaptic activity and nuclear calcium signaling protect hippocampal neurons from death signal-associated nuclear translocation of FoxO3a induced by extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem*, 285, 19354-61.

Diederich, K., Quennet, V., Bauer, H., Muller, H. D., Wersching, H., Schabitz, W. R., Minnerup, J. & Sommer, C. 2012. Successful regeneration after experimental stroke by granulocyte-colony stimulating factor is not further enhanced by constraint-induced movement therapy either in concurrent or in sequential combination therapy. *Stroke*, 43, 185-92.

Dieterich, D. C., Karpova, A., Mikhaylova, M., Zdobnova, I., Konig, I., Landwehr, M., Kreutz, M., Smalla, K. H., Richter, K., Landgraf, P., Reissner, C., Boeckers, T. M., Zuschratter, W., Spilker, C., Seidenbecher, C. I., Garner, C. C., Gundelfinger, E. D. & Kreutz, M. R. 2008. Caldendrin-Jacob: a protein liaison that couples NMDA receptor signalling to the nucleus. *PLoS Biol*, 6, e34.

Dietrich, W. D., Watson, B. D., Busto, R., Ginsberg, M. D. & Bethea, J. R. 1987. Photochemically induced cerebral infarction. I. Early microvascular alterations. *Acta Neuropathol*, 72, 315-25.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. & Traynelis, S. F. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*, 51, 7-61.

Dirnagl, U. 2010. *Rodent models of stroke*, New York, N.Y., Humana Press.

Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M. A. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22, 391-7.

Dong, Y. N., Waxman, E. A. & Lynch, D. R. 2004. Interactions of postsynaptic density-95 and the NMDA receptor 2 subunit control calpain-mediated cleavage of the NMDA receptor. *J Neurosci*, 24, 11035-45.

Dracheva, S., Marras, S. A., Elhakem, S. L., Kramer, F. R., Davis, K. L. & Haroutunian, V. 2001. N-methyl-D-aspartic acid receptor expression in the dorsolateral prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 158, 1400-10.

Du, W., Huang, J., Yao, H., Zhou, K., Duan, B. & Wang, Y. 2010. Inhibition of TRPC6 degradation suppresses ischemic brain damage in rats. *J Clin Invest*, 120, 3480-92.

Dugan, L. L. & Choi, D. W. 1994. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. *Ann Neurol*, 35 Suppl, S17-21.

Duverle, D. A., Ono, Y., Sorimachi, H. & Mamitsuka, H. 2011. Calpain cleavage prediction using multiple kernel learning. *PLoS One*, 6, e19035.

Egea, J., Parada, E., Gomez-Rangel, V., Buendia, I., Negredo, P., Montell, E., Ruhi, R., Verges, J., Roda, J. M., Garcia, A. G. & Lopez, M. G. 2014. Small synthetic hyaluronan disaccharides afford neuroprotection in brain ischemia-related models. *Neuroscience*, 265, 313-22.

El-Husseini, A.-D., Schnell, E., Dakoji, S., Sweeney, N., Zhou, Q., Prange, O., Gauthier-Campbell, C., Aguilera-Moreno, A., Nicoll, R. A. & Brecht, D. S. 2002. Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD-95. *Cell*, 108, 849-63.

El-Husseini, A. E., Craven, S. E., Chetkovich, D. M., Firestein, B. L., Schnell, E., Aoki, C. & Brecht, D. S. 2000a. Dual palmitoylation of PSD-95 mediates its vesiculotubular sorting, postsynaptic targeting, and ion channel clustering. *J Cell Biol*, 148, 159-72.

El-Husseini, A. E., Schnell, E., Chetkovich, D. M., Nicoll, R. A. & Brecht, D. S. 2000b. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science*, 290, 1364-8.

Fan, Y. X., Zhang, Y. & Shen, H. B. 2013. LabCaS: labeling calpain substrate cleavage sites from amino acid sequence using conditional random fields. *Proteins*, 81, 622-34.

Feng, W. & Zhang, M. 2009. Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nat Rev Neurosci*, 10, 87-99.

Ferrand-Drake, M., Zhu, C., Gido, G., Hansen, A. J., Karlsson, J. O., Bahr, B. A., Zamzami, N., Kroemer, G., Chan, P. H., Wieloch, T. & Blomgren, K. 2003. Cyclosporin A prevents calpain activation despite increased intracellular calcium concentrations, as well as translocation of apoptosis-inducing factor, cytochrome c and caspase-3 activation in neurons exposed to transient hypoglycemia. *J Neurochem*, 85, 1431-42.

Ferrer-Montiel, A. V., Merino, J. M., Blondelle, S. E., Perez-Paya, E., Houghten, R. A. & Montal, M. 1998. Selected peptides targeted to the NMDA receptor channel protect neurons from excitotoxic death. *Nat Biotechnol*, 16, 286-91.

Fisher, M. 1997. Characterizing the target of acute stroke therapy. *Stroke*, 28, 866-72.

Frauenknecht, K., Diederich, K., Leukel, P., Bauer, H., Schabitz, W. R., Sommer, C. J. & Minnerup, J. 2016. Functional Improvement after Photothrombotic Stroke in Rats Is Associated with Different Patterns of Dendritic Plasticity after G-CSF Treatment and G-CSF Treatment Combined with Concomitant or Sequential Constraint-Induced Movement Therapy. *PLoS One*, 11, e0146679.

Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., Murakami, K., Kawase, M. & Chan, P. H. 1998. Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18, 1239-47.

Gamir-Morralla, A., Lopez-Menendez, C., Ayuso-Dolado, S., Tejada, G. S., Montaner, J., Rosell, A., Iglesias, T. & Diaz-Guerra, M. 2015. Development of a neuroprotective peptide that preserves survival pathways by preventing Kidins220/ARMS calpain processing induced by excitotoxicity. *Cell Death Dis*, 6, e1939.

Gardoni, F., Polli, F., Cattabeni, F. & Di Luca, M. 2006. Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation modulates PSD-95 binding to NMDA receptors. *Eur J Neurosci*, 24, 2694-704.

Gascon, S., Paez-Gomez, J. A., Diaz-Guerra, M., Scheiffele, P. & Scholl, F. G. 2008a. Dual-promoter lentiviral vectors for constitutive and regulated gene expression in neurons. *J Neurosci Methods*, 168, 104-12.

Gascon, S., Sobrado, M., Roda, J. M., Rodriguez-Pena, A. & Diaz-Guerra, M. 2008b. Excitotoxicity and focal cerebral ischemia induce truncation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor and cleavage of the scaffolding protein PSD-95. *Mol Psychiatry*, 13, 99-114.

Gaudilliere, B., Shi, Y. & Bonni, A. 2002. RNA interference reveals a requirement for myocyte enhancer factor 2A in activity-dependent neuronal survival. *J Biol Chem*, 277, 46442-6.

Ginsberg, M. D. 2003. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke*, 34, 214-23.

Gladstone, D. J., Black, S. E., Hakim, A. M., Heart & Stroke Foundation of Ontario Centre of Excellence in Stroke, R. 2002. Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke*, 33, 2123-36.

Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. & Cong, J. 2003. The calpain system. *Physiol Rev*, 83, 731-801.

Gong, Y., Lippa, C. F., Zhu, J., Lin, Q. & Rosso, A. L. 2009. Disruption of glutamate receptors at Shank-postsynaptic platform in Alzheimer's disease. *Brain Res*, 1292, 191-8.

Gonsette, R. E. 2008. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *J Neurol Sci*, 274, 48-53.

González-Camacho, S. 2012. Caracterización funcional del procesamiento de las subunidades GluN2 del receptor de glutamato tipo NMDA producido en excitotoxicidad e isquemia cerebral.

Gray, J. A., Shi, Y., Usui, H., During, M. J., Sakimura, K. & Nicoll, R. A. 2011. Distinct modes of AMPA receptor suppression at developing synapses by GluN2A and GluN2B: single-cell NMDA receptor subunit deletion in vivo. *Neuron*, 71, 1085-101.

Gray, N. W., Weimer, R. M., Bureau, I. & Svoboda, K. 2006. Rapid redistribution of synaptic PSD-95 in the neocortex in vivo. *PLoS Biol*, 4, e370.

Grimes, C. A. & Jope, R. S. 2001. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol*, 65, 391-426.

Groc, L., Heine, M., Cousins, S. L., Stephenson, F. A., Lounis, B., Cognet, L. & Choquet, D. 2006. NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 18769-74.

Gundersen, V., Fonnum, F., Ottersen, O. P. & Storm-Mathisen, J. 2001. Redistribution of neuroactive amino acids in hippocampus and striatum during hypoglycemia: a quantitative immunogold study. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21, 41-51.

Gunel, M. & Lifton, R. P. 1996. Counting strokes. *Nat Genet*, 13, 384-5.

Haces, M. L., Hernandez-Fonseca, K., Medina-Campos, O. N., Montiel, T., Pedraza-Chaverri, J. & Massieu, L. 2008. Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Exp Neurol*, 211, 85-96.

Haces, M. L. & Massieu, L. 2005. Mecanismos de muerte neuronal asociados a la hipoglucemia. *Arch Neurocién (Mex)*, 10, 83-91.

Hacke, W. & Lichy, C. 2008. Thrombolysis for acute stroke under antiplatelet therapy: safe enough to be beneficial? *Nat Clin Pract Neurol*, 4, 474-5.

Hackos, D. H., Lupardus, P. J., Grand, T., Chen, Y., Wang, T. M., Reynen, P., Gustafson, A., Wallweber, H. J., Volgraf, M., Sellers, B. D., Schwarz, J. B., Paoletti, P., Sheng, M., Zhou, Q. & Hanson, J. E. 2016. Positive Allosteric Modulators of GluN2A-Containing NMDARs with Distinct Modes of Action and Impacts on Circuit Function. *Neuron*, 89, 983-99.

Hafner, A. S., Penn, A. C., Grillo-Bosch, D., Retailliau, N., Poujol, C., Philippat, A., Coussen, F., Sainlos, M., Opazo, P. & Choquet, D. 2015. Lengthening of the Stargazin Cytoplasmic Tail Increases Synaptic Transmission by Promoting Interaction to Deeper Domains of PSD-95. *Neuron*, 86, 475-89.

Hajimohammadreza, I., Raser, K. J., Nath, R., Nadimpalli, R., Scott, M. & Wang, K. K. 1997. Neuronal nitric oxide synthase and calmodulin-dependent protein kinase IIalpha undergo neurotoxin-induced proteolysis. *J Neurochem*, 69, 1006-13.

Hallett, P. J., Dunah, A. W., Ravenscroft, P., Zhou, S., Bezard, E., Crossman, A. R., Brotchie, J. M. & Standaert, D. G. 2005. Alterations of striatal NMDA receptor subunits associated with the development of

dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 48, 503-16.

Hardingham, G. E., Arnold, F. J. & Bading, H. 2001. A calcium microdomain near NMDA receptors: on switch for ERK-dependent synapse-to-nucleus communication. *Nat Neurosci*, 4, 565-6.

Hardingham, G. E. & Bading, H. 2010. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*, 11, 682-96.

Hardingham, G. E., Fukunaga, Y. & Bading, H. 2002. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*, 5, 405-14.

Hell, J. W., Westenbroek, R. E., Breeze, L. J., Wang, K. K., Chavkin, C. & Catterall, W. A. 1996. N-methyl-D-aspartate receptor-induced proteolytic conversion of postsynaptic class C L-type calcium channels in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 3362-7.

Henson, M. A., Roberts, A. C., Perez-Otano, I. & Philpot, B. D. 2010. Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog Neurobiol*, 91, 23-37.

Hill, M. D., Martin, R. H., Mikulis, D., Wong, J. H., Silver, F. L., Terbrugge, K. G., Milot, G., Clark, W. M., Macdonald, R. L., Kelly, M. E., Boulton, M., Fleetwood, I., Mcdougall, C., Gunnarsson, T., Chow, M., Lum, C., Dodd, R., Poublanc, J., Krings, T., Demchuk, A. M., Goyal, M., Anderson, R., Bishop, J., Garman, D. & Tymianski, M. 2012. Safety and efficacy of NA-1 in patients with iatrogenic stroke after endovascular aneurysm repair (ENACT): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*, 11, 942-50.

Hollmann, M. & Heinemann, S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, 17, 31-108.

Hoover, B. R., Reed, M. N., Su, J., Penrod, R. D., Kotilinek, L. A., Grant, M. K., Pitstick, R., Carlson, G. A., Lanier, L. M., Yuan, L. L., Ashe, K. H. & Liao, D. 2010. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron*, 68, 1067-81.

Hoque, A., Hossain, M. I., Ameen, S. S., Ang, C. S., Williamson, N., Ng, D. C., Chueh, A. C., Roulston, C. & Cheng, H. C. 2016. A beacon of hope in stroke therapy-Blockade of pathologically activated cellular events in excitotoxic neuronal death as potential neuroprotective strategies. *Pharmacol Ther*, 160, 159-79.

Hossain, M. I., Roulston, C. L., Kamaruddin, M. A., Chu, P. W., Ng, D. C., Dusting, G. J., Bjorge, J. D., Williamson, N. A., Fujita, D. J., Cheung, S. N., Chan, T. O., Hill, A. F. & Cheng, H. C. 2013. A truncated fragment of Src protein kinase generated by calpain-mediated cleavage is a mediator of neuronal death in excitotoxicity. *J Biol Chem*, 288, 9696-709.

Hossmann, K. A. 1996. Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 8, 195-208.

Hou, X. Y., Zhang, G. Y., Wang, D. G., Guan, Q. H. & Yan, J. Z. 2005. Suppression of postsynaptic density protein 95 by antisense oligonucleotides diminishes posts ischemic pyramidal cell death in rat hippo-

campal CA1 subfield. *Neurosci Lett*, 385, 230-3.

Hu, N. W., Klyubin, I., Anwyl, R. & Rowan, M. J. 2009. GluN2B subunit-containing NMDA receptor antagonists prevent Abeta-mediated synaptic plasticity disruption in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 20504-9.

Huang, Y., Lu, W., Ali, D. W., Pelkey, K. A., Pitcher, G. M., Lu, Y. M., Aoto, H., Roder, J. C., Sasaki, T., Salter, M. W. & Macdonald, J. F. 2001. CAKbeta/Pyk2 kinase is a signaling link for induction of long-term potentiation in CA1 hippocampus. *Neuron*, 29, 485-96.

Husi, H., Ward, M. A., Choudhary, J. S., Blackstock, W. P. & Grant, S. G. 2000. Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat Neurosci*, 3, 661-9.

Hynd, M. R., Scott, H. L. & Dodd, P. R. 2004. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 45, 583-95.

Iadecola, C. 1997. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci*, 20, 132-9.

Iasevoli, F., Tomasetti, C. & De Bartolomeis, A. 2013. Scaffolding proteins of the post-synaptic density contribute to synaptic plasticity by regulating receptor localization and distribution: relevance for neuropsychiatric diseases. *Neurochem Res*, 38, 1-22.

Iqbal Hossain, M., Hoque, A., Lessene, G., Aizuddin Kamaruddin, M., Chu, P. W., Ng, I. H., Irtegun, S., Ng, D. C., Bogoyevitch, M. A., Burgess, A. W., Hill, A. F. & Cheng, H. C. 2015. Dual role of Src kinase in governing neuronal survival. *Brain Res*, 1594, 1-14.

Ivanova, S., Repnik, U., Banks, L., Turk, V. & Turk, B. 2007. Cellular localization of MAGI-1 caspase cleavage products and their role in apoptosis. *Biol Chem*, 388, 1195-8.

Iwasaki, Y., Negishi, T., Inoue, M., Tashiro, T., Tabira, T. & Kimura, N. 2012. Sendai virus vector-mediated brain-derived neurotrophic factor expression ameliorates memory deficits and synaptic degeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, 90, 981-9.

Jaffe, H., Vinade, L. & Dosemeci, A. 2004. Identification of novel phosphorylation sites on postsynaptic density proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 321, 210-8.

Jaffrey, S. R. & Snyder, S. H. 1995. Nitric oxide: a neural messenger. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11, 417-40.

Ji, Y. B., Zhuang, P. P., Ji, Z., Wu, Y. M., Gu, Y., Gao, X. Y., Pan, S. Y. & Hu, Y. F. 2017. TFP5 peptide, derived from CDK5-activating cofactor p35, provides neuroprotection in early-stage of adult ischemic stroke. *Sci Rep*, 7, 40013.

Jin, N., Qian, W., Yin, X., Zhang, L., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Gong, C. X. & Liu, F. 2013. CREB

regulates the expression of neuronal glucose transporter 3: a possible mechanism related to impaired brain glucose uptake in Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res*, 41, 3240-56.

Julio-Amilpas, A., Montiel, T., Soto-Tinoco, E., Geronimo-Olvera, C. & Massieu, L. 2015. Protection of hypoglycemia-induced neuronal death by beta-hydroxybutyrate involves the preservation of energy levels and decreased production of reactive oxygen species. *J Cereb Blood Flow Metab*, 35, 851-60.

Kalia, L. V., Pitcher, G. M., Pelkey, K. A. & Salter, M. W. 2006. PSD-95 is a negative regulator of the tyrosine kinase Src in the NMDA receptor complex. *EMBO J*, 25, 4971-82.

Kalia, L. V. & Salter, M. W. 2003. Interactions between Src family protein tyrosine kinases and PSD-95. *Neuropharmacology*, 45, 720-8.

Kim, E. & Sheng, M. 2004. PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci*, 5, 771-81.

Kim, M. J., Futai, K., Jo, J., Hayashi, Y., Cho, K. & Sheng, M. 2007. Synaptic accumulation of PSD-95 and synaptic function regulated by phosphorylation of serine-295 of PSD-95. *Neuron*, 56, 488-502.

Kleinschnitz, C., Mencl, S., Kleikers, P. W., Schuhmann, M. K., M, G. L., Casas, A. I., Surun, B., Reif, A. & Schmidt, H. H. 2016. NOS knockout or inhibition but not disrupting PSD-95-NOS interaction protect against ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 36, 1508-12.

Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B. & Seeburg, P. H. 1995. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, 269, 1737-40.

Krainc, D., Bai, G., Okamoto, S., Carles, M., Kusiak, J. W., Brent, R. N. & Lipton, S. A. 1998. Synergistic activation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 promoter by myocyte enhancer factor 2C and Sp1. *J Biol Chem*, 273, 26218-24.

Labat-Gest, V. & Tomasi, S. 2013. Photothrombotic ischemia: a minimally invasive and reproducible photochemical cortical lesion model for mouse stroke studies. *J Vis Exp*.

Lai, T. W., Shyu, W. C. & Wang, Y. T. 2011. Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond. *Trends Mol Med*, 17, 266-75.

Languren, G., Montiel, T., Julio-Amilpas, A. & Massieu, L. 2013. Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: An integrated view. *Neurochem Int*, 63, 331-43.

Lau, C. G. & Zukin, R. S. 2007. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*, 8, 413-26.

Lau, D. & Bading, H. 2009. Synaptic activity-mediated suppression of p53 and induction of nuclear calcium-regulated neuroprotective genes promote survival through inhibition of mitochondrial permeability transition. *J Neurosci*, 29, 4420-9.

Lau, D., Bengtson, C. P., Buchthal, B. & Bading, H. 2015. BDNF Reduces Toxic Extrasynaptic NMDA Receptor Signaling via Synaptic NMDA Receptors and Nuclear-Calcium-Induced Transcription of *inhba/Activin A*. *Cell Rep*, 12, 1353-66.

Lau, G. C., Saha, S., Faris, R. & Russek, S. J. 2004. Up-regulation of NMDAR1 subunit gene expression in cortical neurons via a PKA-dependent pathway. *J Neurochem*, 88, 564-75.

Laurie, D. J. & Seeburg, P. H. 1994. Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *J Neurosci*, 14, 3180-94.

Lee, B., Butcher, G. Q., Hoyt, K. R., Impey, S. & Obrietan, K. 2005. Activity-dependent neuroprotection and cAMP response element-binding protein (CREB): kinase coupling, stimulus intensity, and temporal regulation of CREB phosphorylation at serine 133. *J Neurosci*, 25, 1137-48.

Lee, J. K., Park, M. S., Kim, Y. S., Moon, K. S., Joo, S. P., Kim, T. S., Kim, J. H. & Kim, S. H. 2007. Photochemically induced cerebral ischemia in a mouse model. *Surg Neurol*, 67, 620-5; discussion 625.

Lei, G., Xue, S., Chery, N., Liu, Q., Xu, J., Kwan, C. L., Fu, Y. P., Lu, Y. M., Liu, M., Harder, K. W. & Yu, X. M. 2002. Gain control of N-methyl-D-aspartate receptor activity by receptor-like protein tyrosine phosphatase alpha. *EMBO J*, 21, 2977-89.

Leveille, F., Papadia, S., Fricker, M., Bell, K. F., Soriano, F. X., Martel, M. A., Puddifoot, C., Habel, M., Wyllie, D. J., Ikonomidou, C., Tolkovsky, A. M. & Hardingham, G. E. 2010. Suppression of the intrinsic apoptosis pathway by synaptic activity. *J Neurosci*, 30, 2623-35.

Li, S., Hong, S., Shepardson, N. E., Walsh, D. M., Shankar, G. M. & Selkoe, D. 2009. Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron*, 62, 788-801.

Liu, J., Liu, M. C. & Wang, K. K. 2008. Calpain in the CNS: from synaptic function to neurotoxicity. *Sci Signal*, 1, re1.

Liu, X. H., Geng, Z., Yan, J., Li, T., Chen, Q., Zhang, Q. Y. & Chen, Z. Y. 2015. Blocking GSK3beta-mediated dynamin1 phosphorylation enhances BDNF-dependent TrkB endocytosis and the protective effects of BDNF in neuronal and mouse models of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 74, 377-91.

Liu, Y., Wong, T. P., Aarts, M., Rooyackers, A., Liu, L., Lai, T. W., Wu, D. C., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A. M. & Wang, Y. T. 2007. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci*, 27, 2846-57.

Liu, Z., Cao, J., Gao, X., Ma, Q., Ren, J. & Xue, Y. 2011. GPS-CCD: a novel computational program for the prediction of calpain cleavage sites. *PLoS One*, 6, e19001.

Lo, E. H., Dalkara, T. & Moskowitz, M. A. 2003. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke.

Nat Rev Neurosci, 4, 399-415.

Lopez-Menendez, C., Gamir-Morralla, A., Jurado-Arjona, J., Higuero, A. M., Campanero, M. R., Ferrer, I., Hernandez, F., Avila, J., Diaz-Guerra, M. & Iglesias, T. 2013. Kidins220 accumulates with tau in human Alzheimer's disease and related models: modulation of its calpain-processing by GSK3beta/PP1 imbalance. *Hum Mol Genet*, 22, 466-82.

Lorrio, S., Gomez-Rangel, V., Negredo, P., Egea, J., Leon, R., Romero, A., Dal-Cim, T., Villarroya, M., Rodriguez-Franco, M. I., Conde, S., Arce, M. P., Roda, J. M., Garcia, A. G. & Lopez, M. G. 2013. Novel multitarget ligand ITH33/IQM9.21 provides neuroprotection in in vitro and in vivo models related to brain ischemia. *Neuropharmacology*, 67, 403-11.

Luo, H. R., Hattori, H., Hossain, M. A., Hester, L., Huang, Y., Lee-Kwon, W., Donowitz, M., Nagata, E. & Snyder, S. H. 2003. Akt as a mediator of cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 11712-7.

Luong, T. N., Carlisle, H. J., Southwell, A. & Patterson, P. H. 2011. Assessment of Motor Balance and Coordination in Mice using the Balance Beam. *Journal of Visualized Experiments*.

Luscher, C. & Huber, K. M. 2010. Group 1 mGluR-dependent synaptic long-term depression: mechanisms and implications for circuitry and disease. *Neuron*, 65, 445-59.

Lussier, M. P., Sanz-Clemente, A. & Roche, K. W. 2015. Dynamic Regulation of N-Methyl-d-aspartate (NMDA) and alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors by Post-translational Modifications. *J Biol Chem*, 290, 28596-603.

Ma, S., Liu, S., Huang, Q., Xie, B., Lai, B., Wang, C., Song, B. & Li, M. 2012. Site-specific phosphorylation protects glycogen synthase kinase-3beta from calpain-mediated truncation of its N and C termini. *J Biol Chem*, 287, 22521-32.

Mao, Z., Bonni, A., Xia, F., Nadal-Vicens, M. & Greenberg, M. E. 1999. Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science*, 286, 785-90.

Marini, A. M., Rabin, S. J., Lipsky, R. H. & Mochetti, I. 1998. Activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor underlies the neuroprotective effect of N-methyl-D-aspartate. *J Biol Chem*, 273, 29394-9.

Martel, M. A., Ryan, T. J., Bell, K. F., Fowler, J. H., McMahon, A., Al-Mubarak, B., Komiyama, N. H., Horsburgh, K., Kind, P. C., Grant, S. G., Wyllie, D. J. & Hardingham, G. E. 2012. The subtype of GluN2 C-terminal domain determines the response to excitotoxic insults. *Neuron*, 74, 543-56.

Matsumoto, K., Vaughn, M., Bruce, B. D., Koutsopoulos, S. & Zhang, S. 2009. Designer peptide surfactants stabilize functional photosystem-I membrane complex in aqueous solution for extended time. *J Phys Chem B*, 113, 75-83.

Mayr, B. & Montminy, M. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 599-609.

Mccann, J. J., Zheng, L., Rohrbeck, D., Felekyan, S., Kuhnemuth, R., Sutton, R. B., Seidel, C. A. & Bowen, M. E. 2012. Supertertiary structure of the synaptic MAGuK scaffold proteins is conserved. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 15775-80.

Mcculloch, C. E. & Searle, S. R. 2005. *Longitudinal Data. Generalized, Linear, and Mixed Models*. John Wiley & Sons, Inc.

Meldrum, B. S. 1993. Excitotoxicity and selective neuronal loss in epilepsy. *Brain Pathol*, 3, 405-12.

Meloni, B. P., Brookes, L. M., Clark, V. W., Cross, J. L., Edwards, A. B., Anderton, R. S., Hopkins, R. M., Hoffmann, K. & Knuckey, N. W. 2015. Poly-arginine and arginine-rich peptides are neuroprotective in stroke models. *J Cereb Blood Flow Metab*, 35, 993-1004.

Mellstrom, B., Torres, B., Link, W. A. & Naranjo, J. R. 2004. The BDNF gene: exemplifying complexity in Ca²⁺-dependent gene expression. *Crit Rev Neurobiol*, 16, 43-9.

Michaelis, E. K. 1998. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol*, 54, 369-415.

Milletti, F. 2012. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today*, 17, 850-60.

Mo, S. F., Liao, G. Y., Yang, J., Wang, M. Y., Hu, Y., Lian, G. N., Kong, L. D. & Zhao, Y. 2016. Protection of neuronal cells from excitotoxicity by disrupting nNOS-PSD95 interaction with a small molecule SCR-4026. *Brain Res*, 1648, 250-6.

Moghaddam, B. & Javitt, D. 2012. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology*, 37, 4-15.

Montaner, J., Campos, M., Cristobo, I., Giralt, D. & Díaz-Guerra, M. 2013. Role of PSD-95 inhibitors in stroke and neuroprotection: a systemic view on NA-1 (Tat-NR2B9c). *Drugs of the Future*, 30.

Mony, L., Kew, J. N., Gunthorpe, M. J. & Paoletti, P. 2009. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br J Pharmacol*, 157, 1301-17.

Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B. & Seeburg, P. H. 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12, 529-40.

Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B. & Seeburg, P. H. 1992. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, 256, 1217-21.

Morabito, M. A., Sheng, M. & Tsai, L. H. 2004. Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates the N-terminal domain of the postsynaptic density protein PSD-95 in neurons. *J Neurosci*, 24, 865-76.

Mori, H. & Mishina, M. 1995. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*, 34, 1219-37.

Morikawa, E., Mori, H., Kiyama, Y., Mishina, M., Asano, T. & Kirino, T. 1998. Attenuation of Focal Ischemic Brain Injury in Mice Deficient in the epsilon 1 (NR2A) Subunit of NMDA Receptor. *J. Neurosci.*, 18, 9727-9732.

Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N. & Nakanishi, S. 1991. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*, 354, 31-7.

Mothet, J. P., Le Bail, M. & Billard, J. M. 2015. Time and space profiling of NMDA receptor co-agonist functions. *J Neurochem*, 135, 210-25.

Muddashetty, R. S., Kelic, S., Gross, C., Xu, M. & Bassell, G. J. 2007. Dysregulated metabotropic glutamate receptor-dependent translation of AMPA receptor and postsynaptic density-95 mRNAs at synapses in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci*, 27, 5338-48.

Mueller, H. T. & Meador-Woodruff, J. H. 2004. NR3A NMDA receptor subunit mRNA expression in schizophrenia, depression and bipolar disorder. *Schizophr Res*, 71, 361-70.

Naguib, J. M., Kulinskaya, E., Lomax, C. L. & Garralda, M. E. 2009. Neuro-cognitive performance in children with type 1 diabetes--a meta-analysis. *J Pediatr Psychol*, 34, 271-82.

Nedrelew, J. H., Cianci, C. D. & Morrow, J. S. 2003. c-Src binds alpha II spectrin's Src homology 3 (SH3) domain and blocks calpain susceptibility by phosphorylating Tyr1176. *J Biol Chem*, 278, 7735-41.

Nelson, C. D., Kim, M. J., Hsin, H., Chen, Y. & Sheng, M. 2013. Phosphorylation of threonine-19 of PSD-95 by GSK-3beta is required for PSD-95 mobilization and long-term depression. *J Neurosci*, 33, 12122-35.

Nellgard, B. & Wieloch, T. 1992. Cerebral protection by AMPA- and NMDA-receptor antagonists administered after severe insulin-induced hypoglycemia. *Exp Brain Res*, 92, 259-66.

Nguyen, T. H., Liu, J. & Lombroso, P. J. 2002. Striatal enriched phosphatase 61 dephosphorylates Fyn at phosphotyrosine 420. *J Biol Chem*, 277, 24274-9.

Nicolas, G., Fournier, C. M., Galand, C., Malbert-Colas, L., Bournier, O., Krowiarski, Y., Bourgeois, M., Camonis, J. H., Dhermy, D., Grandchamp, B. & Lecomte, M. C. 2002. Tyrosine phosphorylation regulates alpha II spectrin cleavage by calpain. *Mol Cell Biol*, 22, 3527-36.

Ning, K., Pei, L., Liao, M., Liu, B., Zhang, Y., Jiang, W., Mielke, J. G., Li, L., Chen, Y., El-Hayek, Y. H.,

Fehlings, M. G., Zhang, X., Liu, F., Eubanks, J. & Wan, Q. 2004. Dual neuroprotective signaling mediated by downregulating two distinct phosphatase activities of PTEN. *J Neurosci*, 24, 4052-60.

Noritake, J., Fukata, Y., Iwanaga, T., Hosomi, N., Tsutsumi, R., Matsuda, N., Tani, H., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Kodama, T., Matsuura, Y., Brecht, D. S., Hamakubo, T. & Fukata, M. 2009. Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. *J Cell Biol*, 186, 147-60.

Ohnuma, T., Kato, H., Arai, H., Faull, R. L., Mckenna, P. J. & Emson, P. C. 2000. Gene expression of PSD95 in prefrontal cortex and hippocampus in schizophrenia. *Neuroreport*, 11, 3133-7.

Olney, J. W. 1986. Inciting excitotoxic cytotoxicity among central neurons. *Adv Exp Med Biol*, 203, 631-45.

Ono, Y. & Sorimachi, H. 2012. Calpains: an elaborate proteolytic system. *Biochim Biophys Acta*, 1824, 224-36.

Pak, D. T., Yang, S., Rudolph-Correia, S., Kim, E. & Sheng, M. 2001. Regulation of dendritic spine morphology by SPAR, a PSD-95-associated RapGAP. *Neuron*, 31, 289-303.

Palay, S. L. 1956. Synapses in the central nervous system. *J Biophys Biochem Cytol*, 2, 193-202.

Pan, L., Chen, J., Yu, J., Yu, H. & Zhang, M. 2011. The structure of the PDZ3-SH3-GuK tandem of ZO-1 protein suggests a supramodular organization of the membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family scaffold protein core. *J Biol Chem*, 286, 40069-74.

Paoletti, P., Bellone, C. & Zhou, Q. 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, 14, 383-400.

Paoletti, P. & Neyton, J. 2007. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*, 7, 39-47.

Papadia, S., Soriano, F. X., Leveille, F., Martel, M. A., Dakin, K. A., Hansen, H. H., Kaindl, A., Siffringer, M., Fowler, J., Stefovskaja, V., McKenzie, G., Craighero, M., Corriveau, R., Ghazal, P., Horsburgh, K., Yankner, B. A., Wyllie, D. J., Ikonomidou, C. & Hardingham, G. E. 2008. Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat Neurosci*, 11, 476-87.

Parada, E., Buendia, I., Leon, R., Negredo, P., Romero, A., Cuadrado, A., Lopez, M. G. & Egea, J. 2014. Neuroprotective effect of melatonin against ischemia is partially mediated by alpha-7 nicotinic receptor modulation and HO-1 overexpression. *J Pineal Res*, 56, 204-12.

Paramo, B., Hernandez-Fonseca, K., Estrada-Sanchez, A. M., Jimenez, N., Hernandez-Cruz, A. & Massieu, L. 2010. Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, 167, 1057-69.

Paramo, B., Montiel, T., Hernandez-Espinosa, D. R., Rivera-Martinez, M., Moran, J. & Massieu, L. 2013.

Calpain activation induced by glucose deprivation is mediated by oxidative stress and contributes to neuronal damage. *Int J Biochem Cell Biol*, 45, 2596-604.

Park, J. S., Bateman, M. C. & Goldberg, M. P. 1996. Rapid alterations in dendrite morphology during sublethal hypoxia or glutamate receptor activation. *Neurobiol Dis*, 3, 215-27.

Parsons, M. P. & Raymond, L. A. 2014. Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron*, 82, 279-93.

Paupard, M. C., Friedman, L. K. & Zukin, R. S. 1997. Developmental regulation and cell-specific expression of N-methyl-D-aspartate receptor splice variants in rat hippocampus. *Neuroscience*, 79, 399-409.

Perez-Otano, I., Larsen, R. S. & Wesseling, J. F. 2016. Emerging roles of GluN3-containing NMDA receptors in the CNS. *Nat Rev Neurosci*, 17, 623-35.

Perez-Otano, I., Schulteis, C. T., Contractor, A., Lipton, S. A., Trimmer, J. S., Sucher, N. J. & Heinemann, S. F. 2001. Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J Neurosci*, 21, 1228-37.

Pevsner, P. H., Eichenbaum, J. W., Miller, D. C., Pivawer, G., Eichenbaum, K. D., Stern, A., Zakian, K. L. & Koutcher, J. A. 2001. A photothrombotic model of small early ischemic infarcts in the rat brain with histologic and MRI correlation. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 45, 227-33.

Pfeiffer, B. E. & Huber, K. M. 2009. The state of synapses in fragile X syndrome. *Neuroscientist*, 15, 549-67.

Pottorf, W. J., 2nd, Johanns, T. M., Derrington, S. M., Strehler, E. E., Enyedi, A. & Thayer, S. A. 2006. Glutamate-induced protease-mediated loss of plasma membrane Ca²⁺ pump activity in rat hippocampal neurons. *J Neurochem*, 98, 1646-56.

Qian, C., Li, P. C., Jiao, Y., Yao, H. H., Chen, Y. C., Yang, J., Ding, J., Yang, X. Y. & Teng, G. J. 2016. Precise Characterization of the Penumbra Revealed by MRI: A Modified Photothrombotic Stroke Model Study. *PLoS One*, 11, e0153756.

Quinn, L. P., Perren, M. J., Brackenborough, K. T., Woodhams, P. L., Vidgeon-Hart, M., Chapman, H., Pangalos, M. N., Upton, N. & Virley, D. J. 2007. A beam-walking apparatus to assess behavioural impairments in MPTP-treated mice: pharmacological validation with R-(-)-deprenyl. *J Neurosci Methods*, 164, 43-9.

Ray, S. K. & Banik, N. L. 2003. Calpain and its involvement in the pathophysiology of CNS injuries and diseases: therapeutic potential of calpain inhibitors for prevention of neurodegeneration. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2, 173-89.

Reichenbach, Z. W., Li, H., Ward, S. J. & Tuma, R. F. 2016. The CB1 antagonist, SR141716A, is protec-

tive in permanent photothrombotic cerebral ischemia. *Neurosci Lett*, 630, 9-15.

Rong, Y., Lu, X., Bernard, A., Khrestchatisky, M. & Baudry, M. 2001. Tyrosine phosphorylation of ionotropic glutamate receptors by Fyn or Src differentially modulates their susceptibility to calpain and enhances their binding to spectrin and PSD-95. *J Neurochem*, 79, 382-90.

Ronicke, R., Mikhaylova, M., Ronicke, S., Meinhardt, J., Schroder, U. H., Fandrich, M., Reiser, G., Kreutz, M. R. & Reymann, K. G. 2011. Early neuronal dysfunction by amyloid beta oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiol Aging*, 32, 2219-28.

Rose, K., Goldberg, M. P. & Choi, D. W. 1993. Citotoxicity in murine neocortical cell culture. *Methods Toxicol.*, 1A, 46-60.

Roselli, F., Tirard, M., Lu, J., Hutzler, P., Lamberti, P., Livrea, P., Morabito, M. & Almeida, O. F. 2005. Soluble beta-amyloid1-40 induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. *J Neurosci*, 25, 11061-70.

Rothman, S. M. & Olney, J. W. 1986. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol*, 19, 105-11.

Rothwell, N. J. & Hopkins, S. J. 1995. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci*, 18, 130-6.

Russwurm, M., Wittau, N. & Koesling, D. 2001. Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J Biol Chem*, 276, 44647-52.

Ryan, T. J., Emes, R. D., Grant, S. G. & Komiyama, N. H. 2008. Evolution of NMDA receptor cytoplasmic interaction domains: implications for organisation of synaptic signalling complexes. *BMC Neurosci*, 9, 6.

Sabio, G., Reuver, S., Feijoo, C., Hasegawa, M., Thomas, G. M., Centeno, F., Kuhlendahl, S., Leal-Ortiz, S., Goedert, M., Garner, C. & Cuenda, A. 2004. Stress- and mitogen-induced phosphorylation of the synapse-associated protein SAP90/PSD-95 by activation of SAPK3/p38gamma and ERK1/ERK2. *Biochem J*, 380, 19-30.

Salazar, I. L., Caldeira, M. V., Curcio, M. & Duarte, C. B. 2016. The Role of Proteases in Hippocampal Synaptic Plasticity: Putting Together Small Pieces of a Complex Puzzle. *Neurochem Res*, 41, 156-82.

Salter, M. W., Dong, Y., Kalia, L. V., Liu, X. J. & Pitcher, G. 2009. Regulation of NMDA Receptors by Kinases and Phosphatases.

Salter, M. W. & Kalia, L. V. 2004. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci*, 5, 317-28.

- Sandberg, M., Butcher, S. P. & Hagberg, H. 1986. Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: in vivo dialysis of the rat hippocampus. *J Neurochem*, 47, 178-84.
- Sans, N., Petralia, R. S., Wang, Y. X., Blahos, J., 2nd, Hell, J. W. & Wenthold, R. J. 2000. A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J Neurosci*, 20, 1260-71.
- Sanz-Clemente, A., Nicoll, R. A. & Roche, K. W. 2013. Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *Neuroscientist*, 19, 62-75.
- Sattler, R., Xiong, Z., Lu, W. Y., Hafner, M., Macdonald, J. F. & Tymianski, M. 1999. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*, 284, 1845-8.
- Scalzo, F., Nour, M. & Liebeskind, D. S. 2015. Data science of stroke imaging and enlightenment of the penumbra. *Front Neurol*, 6, 8.
- Scannevin, R. H. & Huganir, R. L. 2000. Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci*, 1, 133-41.
- Schnell, E., Sizemore, M., Karimzadegan, S., Chen, L., Brecht, D. S. & Nicoll, R. A. 2002. Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 13902-7.
- Schoepp, D., Bockaert, J. & Sladeczek, F. 1990. Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 11, 508-15.
- Schroeter, M., Jander, S. & Stoll, G. 2002. Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses. *J Neurosci Methods*, 117, 43-9.
- Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. & Dowdy, S. F. 1999. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*, 285, 1569-72.
- Sgambato-Faure, V. & Cenci, M. A. 2012. Glutamatergic mechanisms in the dyskinesias induced by pharmacological dopamine replacement and deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 96, 69-86.
- Sharma, G., Lakkadwala, S., Modgil, A. & Singh, J. 2016. The Role of Cell-Penetrating Peptide and Transferrin on Enhanced Delivery of Drug to Brain. *Int J Mol Sci*, 17.
- Shin, H., Hsueh, Y. P., Yang, F. C., Kim, E. & Sheng, M. 2000. An intramolecular interaction between Src homology 3 domain and guanylate kinase-like domain required for channel clustering by postsynaptic density-95/SAP90. *J Neurosci*, 20, 3580-7.
- Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., Nairn, A. C., Salter, M. W.,

Lombroso, P. J., Gouras, G. K. & Greengard, P. 2005. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci*, 8, 1051-8.

Sommerfield, A. J., Deary, I. J., McAulay, V. & Frier, B. M. 2003. Short-term, delayed, and working memory are impaired during hypoglycemia in individuals with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 26, 390-6.

Soriano, F. X., Martel, M. A., Papadia, S., Vaslin, A., Baxter, P., Rickman, C., Forder, J., Tymianski, M., Duncan, R., Aarts, M., Clarke, P., Wyllie, D. J. & Hardingham, G. E. 2008. Specific targeting of pro-death NMDA receptor signals with differing reliance on the NR2B PDZ ligand. *J Neurosci*, 28, 10696-710.

Sorimachi, H., Mamitsuka, H. & Ono, Y. 2012. Understanding the substrate specificity of conventional calpains. *Biol Chem*, 393, 853-71.

Stabach, P. R., Cianci, C. D., Glantz, S. B., Zhang, Z. & Morrow, J. S. 1997. Site-directed mutagenesis of alpha II spectrin at codon 1175 modulates its mu-calpain susceptibility. *Biochemistry*, 36, 57-65.

Steiner, P., Higley, M. J., Xu, W., Czervionke, B. L., Malenka, R. C. & Sabatini, B. L. 2008. Destabilization of the postsynaptic density by PSD-95 serine 73 phosphorylation inhibits spine growth and synaptic plasticity. *Neuron*, 60, 788-802.

Storey, G. P., Opitz-Araya, X. & Barria, A. 2011. Molecular determinants controlling NMDA receptor synaptic incorporation. *J Neurosci*, 31, 6311-6.

Stromstedt, A. A., Pasupuleti, M., Schmidtchen, A. & Malmsten, M. 2009. Evaluation of strategies for improving proteolytic resistance of antimicrobial peptides by using variants of EFK17, an internal segment of LL-37. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 593-602.

Sturgill, J. F., Steiner, P., Czervionke, B. L. & Sabatini, B. L. 2009. Distinct domains within PSD-95 mediate synaptic incorporation, stabilization, and activity-dependent trafficking. *J Neurosci*, 29, 12845-54.

Sugiura, S., Kitagawa, K., Omura-Matsuoka, E., Sasaki, T., Tanaka, S., Yagita, Y., Matsushita, K., Storm, D. R. & Hori, M. 2004. CRE-mediated gene transcription in the peri-infarct area after focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Res*, 75, 401-7.

Sugiyama, H., Ito, I. & Hirono, C. 1987. A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature*, 325, 531-3.

Suh, S. W., Aoyama, K., Chen, Y., Garnier, P., Matsumori, Y., Gum, E., Liu, J. & Swanson, R. A. 2003. Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *J Neurosci*, 23, 10681-90.

Suh, S. W., Garnier, P., Aoyama, K., Chen, Y. & Swanson, R. A. 2004. Zinc release contributes to hypoglycemia-induced neuronal death. *Neurobiol Dis*, 16, 538-45.

Sun, H. S., Doucette, T. A., Liu, Y., Fang, Y., Teves, L., Aarts, M., Ryan, C. L., Bernard, P. B., Lau, A., Forder, J. P., Salter, M. W., Wang, Y. T., Tasker, R. A. & Tymianski, M. 2008. Effectiveness of PSD95 inhibitors in permanent and transient focal ischemia in the rat. *Stroke*, 39, 2544-53.

Sun, Y., Cheng, X., Hu, J. & Gao, Z. 2017. The Role of GluN2A in Cerebral Ischemia: Promoting Neuron Death and Survival in the Early Stage and Thereafter. *Mol Neurobiol*.

Sun, Y., Savanenin, A., Reddy, P. H. & Liu, Y. F. 2001. Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *J Biol Chem*, 276, 24713-8.

Sun, Y., Zhang, L., Chen, Y., Zhan, L. & Gao, Z. 2015. Therapeutic Targets for Cerebral Ischemia Based on the Signaling Pathways of the GluN2B C Terminus. *Stroke*, 46, 2347-53.

Szydlowska, K. & Tymianski, M. 2010. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*, 47, 122-9.

Tabrizi, S. J., Cleeter, M. W., Xuereb, J., Taanman, J. W., Cooper, J. M. & Schapira, A. H. 1999. Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann Neurol*, 45, 25-32.

Takagi, N., Cheung, H. H., Bissoon, N., Teves, L., Wallace, M. C. & Gurd, J. W. 1999. The effect of transient global ischemia on the interaction of Src and Fyn with the N-methyl-D-aspartate receptor and postsynaptic densities: possible involvement of Src homology 2 domains. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19, 880-8.

Tan, Y. W., Zhang, S. J., Hoffmann, T. & Bading, H. 2012. Increasing levels of wild-type CREB up-regulates several activity-regulated inhibitor of death (AID) genes and promotes neuronal survival. *BMC Neurosci*, 13, 48.

Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D. B., Shaywitz, A. J. & Greenberg, M. E. 1998. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*, 20, 709-26.

Tashev, R., Moura, P. J., Venkitaramani, D. V., Prosperetti, C., Centonze, D., Paul, S. & Lombroso, P. J. 2009. A substrate trapping mutant form of striatal-enriched protein tyrosine phosphatase prevents amphetamine-induced stereotypies and long-term potentiation in the striatum. *Biol Psychiatry*, 65, 637-45.

Terasaki, Y., Sasaki, T., Yagita, Y., Okazaki, S., Sugiyama, Y., Oyama, N., Omura-Matsuoka, E., Sakoda, S. & Kitagawa, K. 2010. Activation of NR2A receptors induces ischemic tolerance through CREB signaling. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30, 1441-9.

Teves, L. M., Cui, H. & Tymianski, M. 2016. Efficacy of the PSD95 inhibitor Tat-NR2B9c in mice requires dose translation between species. *J Cereb Blood Flow Metab*, 36, 555-61.

Tezuka, T., Umemori, H., Akiyama, T., Nakanishi, S. & Yamamoto, T. 1999. PSD-95 promotes Fyn-mediated tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 435-40.

Thornton, C., Yaka, R., Dinh, S. & Ron, D. 2003. H-Ras modulates N-methyl-D-aspartate receptor function via inhibition of Src tyrosine kinase activity. *J Biol Chem*, 278, 23823-9.

Tian, M., Xu, J., Lei, G., Lombroso, P. J., Jackson, M. F. & Macdonald, J. F. 2016. STEP activation by Galphaq coupled GPCRs opposes Src regulation of NMDA receptors containing the GluN2A subunit. *Sci Rep*, 6, 36684.

Tompa, P., Buzder-Lantos, P., Tantos, A., Farkas, A., Szilagyi, A., Banoczi, Z., Hudecz, F. & Friedrich, P. 2004. On the sequential determinants of calpain cleavage. *J Biol Chem*, 279, 20775-85.

Topinka, J. R. & Brecht, D. S. 1998. N-terminal palmitoylation of PSD-95 regulates association with cell membranes and interaction with K⁺ channel Kv1.4. *Neuron*, 20, 125-34.

Tornavaca, O., Sarro, E., Pascual, G., Bardaji, B., Montero, M. A., Salcedo, M. T., Plana, M., Lopez-Hellin, J., Itarte, E. & Meseguer, A. 2011. KAP degradation by calpain is associated with CK2 phosphorylation and provides a novel mechanism for cyclosporine A-induced proximal tubule injury. *PLoS One*, 6, e25746.

Tovar, K. R. & Westbrook, G. L. 1999. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci*, 19, 4180-8.

Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J. & Dingledine, R. 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*, 62, 405-96.

Tremper-Wells, B. & Vallano, M. L. 2005. Nuclear calpain regulates Ca²⁺-dependent signaling via proteolysis of nuclear Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV in cultured neurons. *J Biol Chem*, 280, 2165-75.

Tsui, J. & Malenka, R. C. 2006. Substrate localization creates specificity in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II signaling at synapses. *J Biol Chem*, 281, 13794-804.

Tu, J., Zhang, X., Zhu, Y., Dai, Y., Li, N., Yang, F., Zhang, Q., Brann, D. W. & Wang, R. 2015. Cell-Permeable Peptide Targeting the Nrf2-Keap1 Interaction: A Potential Novel Therapy for Global Cerebral Ischemia. *J Neurosci*, 35, 14727-39.

Tu, W., Xu, X., Peng, L., Zhong, X., Zhang, W., Soundarapandian, M. M., Balel, C., Wang, M., Jia, N., Zhang, W., Lew, F., Chan, S. L., Chen, Y. & Lu, Y. 2010. DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke. *Cell*, 140, 222-34.

Valbuena, S. & Lerma, J. 2016. Non-canonical Signaling, the Hidden Life of Ligand-Gated Ion Channels. *Neuron*, 92, 316-329.

Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E. & Robberecht, W. 2006. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*, 1762, 1068-82.

Vashishta, A., Habas, A., Pruunsild, P., Zheng, J. J., Timmusk, T. & Hetman, M. 2009. Nuclear factor of activated T-cells isoform c4 (NFATc4/NFAT3) as a mediator of antiapoptotic transcription in NMDA receptor-stimulated cortical neurons. *J Neurosci*, 29, 15331-40.

Vaslin, A., Puyal, J. & Clarke, P. G. 2009. Excitotoxicity-induced endocytosis confers drug targeting in cerebral ischemia. *Ann Neurol*, 65, 337-47.

Vidaurre, O. G. 2011. Regulación de proteínas en la disyuntiva supervivencia/muerte neuronal en excitotoxicidad e isquemia cerebral: TrkB y PSD-95.

Vissel, B., Krupp, J. J., Heinemann, S. F. & Westbrook, G. L. 2001. A use-dependent tyrosine phosphorylation of NMDA receptors is independent of ion flux. *Nat Neurosci*, 4, 587-96.

Vosler, P. S., Brennan, C. S. & Chen, J. 2008. Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol Neurobiol*, 38, 78-100.

Walton, M. R. & Dragunow, I. 2000. Is CREB a key to neuronal survival? *Trends Neurosci*, 23, 48-53.

Wang, J., Liu, S., Fu, Y., Wang, J. H. & Lu, Y. 2003. Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. *Nat Neurosci*, 6, 1039-47.

Wang, Y., Briz, V., Chishti, A., Bi, X. & Baudry, M. 2013. Distinct roles for mu-calpain and m-calpain in synaptic NMDAR-mediated neuroprotection and extrasynaptic NMDAR-mediated neurodegeneration. *J Neurosci*, 33, 18880-92.

Wang, Z., Yan, P., Hui, T. & Zhang, J. 2014. Epigenetic upregulation of PSD-95 contributes to the rewarding behavior by morphine conditioning. *Eur J Pharmacol*, 732, 123-9.

Washbourne, P. 2004. Greasing transmission: palmitoylation at the synapse. *Neuron*, 44, 901-2.

Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K. & Mishina, M. 1992. Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport*, 3, 1138-40.

Watt, F. & Molloy, P. L. 1993. Specific cleavage of transcription factors by the thiol protease, m-calpain. *Nucleic Acids Res*, 21, 5092-100.

Wei, G., Yin, Y., Li, W., Bito, H., She, H. & Mao, Z. 2012. Calpain-mediated degradation of myocyte enhancer factor 2D contributes to excitotoxicity by activation of extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem*, 287, 5797-805.

Wieloch, T. 1985. Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science*, 230, 681-3.

Won, S., Incontro, S., Nicoll, R. A. & Roche, K. W. 2016. PSD-95 stabilizes NMDA receptors by indu-

cing the degradation of STEP61. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E4736-44.

Won, S. J., Yoo, B. H., Kauppinen, T. M., Choi, B. Y., Kim, J. H., Jang, B. G., Lee, M. W., Sohn, M., Liu, J., Swanson, R. A. & Suh, S. W. 2012. Recurrent/moderate hypoglycemia induces hippocampal dendritic injury, microglial activation, and cognitive impairment in diabetic rats. *J Neuroinflammation*, 9, 182.

Woo, T. U., Walsh, J. P. & Benes, F. M. 2004. Density of glutamic acid decarboxylase 67 messenger RNA-containing neurons that express the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 61, 649-57.

Wood, P. L. & Hawkinson, J. E. 1997. N-methyl-D-aspartate antagonists for stroke and head trauma. *Expert Opin Investig Drugs*, 6, 389-97.

Woronicz, J. D., Lina, A., Calnan, B. J., Szychowski, S., Cheng, L. & Winoto, A. 1995. Regulation of the Nur77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 15, 6364-76.

Wu, G. Y., Deisseroth, K. & Tsien, R. W. 2001. Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 2808-13.

Wu, H. Y., Hsu, F. C., Gleichman, A. J., Bacongus, I., Coulter, D. A. & Lynch, D. R. 2007. Fyn-mediated phosphorylation of NR2B Tyr-1336 controls calpain-mediated NR2B cleavage in neurons and heterologous systems. *J Biol Chem*, 282, 20075-87.

Wu, H. Y., Tomizawa, K., Oda, Y., Wei, F. Y., Lu, Y. F., Matsushita, M., Li, S. T., Moriwaki, A. & Matsui, H. 2004. Critical role of calpain-mediated cleavage of calcineurin in excitotoxic neurodegeneration. *J Biol Chem*, 279, 4929-40.

Wu, P. R., Tsai, P. I., Chen, G. C., Chou, H. J., Huang, Y. P., Chen, Y. H., Lin, M. Y., Kimchi, A., Chien, C. T. & Chen, R. H. 2011. DAPK activates MARK1/2 to regulate microtubule assembly, neuronal differentiation, and tau toxicity. *Cell Death Differ*, 18, 1507-20.

Wyllie, D. J., Livesey, M. R. & Hardingham, G. E. 2013. Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. *Neuropharmacology*, 74, 4-17.

Xu, J., Kurup, P., Zhang, Y., Goebel-Goody, S. M., Wu, P. H., Hawasli, A. H., Baum, M. L., Bibb, J. A. & Lombroso, P. J. 2009. Extrasynaptic NMDA receptors couple preferentially to excitotoxicity via calpain-mediated cleavage of STEP. *J Neurosci*, 29, 9330-43.

Xu, W., Wong, T. P., Chery, N., Gaertner, T., Wang, Y. T. & Baudry, M. 2007. Calpain-mediated mGluR1alpha truncation: a key step in excitotoxicity. *Neuron*, 53, 399-412.

Yaka, R., Thornton, C., Vagts, A. J., Phamluong, K., Bonci, A. & Ron, D. 2002. NMDA receptor function is regulated by the inhibitory scaffolding protein, RACK1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 5710-5.

Yamada, K. H., Kozlowski, D. A., Seidl, S. E., Lance, S., Wieschhaus, A. J., Sundivakkam, P., Tirupathi, C., Chishti, I., Herman, I. M., Kuchay, S. M. & Chishti, A. H. 2012. Targeted gene inactivation of calpain-1 suppresses cortical degeneration due to traumatic brain injury and neuronal apoptosis induced by oxidative stress. *J Biol Chem*, 287, 13182-93.

Yamada, Y., Chochi, Y., Ko, J. A., Sobue, K. & Inui, M. 1999. Activation of channel activity of the NMDA receptor-PSD-95 complex by guanylate kinase-associated protein (GKAP). *FEBS Lett*, 458, 295-8.

Yan, Y. G., Zhang, J., Xu, S. J., Luo, J. H., Qiu, S. & Wang, W. 2014. Clustering of surface NMDA receptors is mainly mediated by the C-terminus of GluN2A in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Bull*, 30, 655-66.

Yin, Y., Wang, Y., Chen, L., Han, S., Zhao, L., Luo, Y. & Li, J. 2013. Tat-collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) increases the survival of neurons after NMDA excitotoxicity by reducing the cleavage of CRMP2. *Neurochem Res*, 38, 2095-104.

Ying, Z., Bingaman, W. & Najm, I. M. 2004. Increased numbers of coassembled PSD-95 to NMDA-receptor subunits NR2B and NR1 in human epileptic cortical dysplasia. *Epilepsia*, 45, 314-21.

Yoon, S. Y., Choi, J. E., Yoon, J. H., Huh, J. W. & Kim, D. H. 2006. BACE inhibitor reduces APP-beta-C-terminal fragment accumulation in axonal swellings of okadaic acid-induced neurodegeneration. *Neurobiol Dis*, 22, 435-44.

Yu, X. M., Askalan, R., Keil, G. J., 2nd & Salter, M. W. 1997. NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosine kinase Src. *Science*, 275, 674-8.

Yuen, E. Y., Liu, W. & Yan, Z. 2007. The phosphorylation state of GluR1 subunits determines the susceptibility of AMPA receptors to calpain cleavage. *J Biol Chem*, 282, 16434-40.

Zerangue, N. & Kavanaugh, M. P. 1996. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature*, 383, 634-7.

Zhang, D., Wang, H., Liu, H., Tao, T., Wang, N. & Shen, A. 2016. nNOS Translocates into the Nucleus and Interacts with Sox2 to Protect Neurons Against Early Excitotoxicity via Promotion of Shh Transcription. *Mol Neurobiol*, 53, 6444-6458.

Zhang, F., Guo, A., Liu, C., Comb, M. & Hu, B. 2013a. Phosphorylation and assembly of glutamate receptors after brain ischemia. *Stroke*, 44, 170-6.

Zhang, J., Saur, T., Duke, A. N., Grant, S. G., Platt, D. M., Rowlett, J. K., Isacson, O. & Yao, W. D. 2014b. Motor impairments, striatal degeneration, and altered dopamine-glutamate interplay in mice lacking PSD-95. *J Neurogenet*, 28, 98-111.

Zhang, L., Hsu, J. C., Takagi, N., Gurd, J. W., Wallace, M. C. & Eubanks, J. H. 1997. Transient global

ischemia alters NMDA receptor expression in rat hippocampus: correlation with decreased immunoreactive protein levels of the NR2A/2B subunits, and an altered NMDA receptor functionality. *J Neurochem*, 69, 1983-94.

Zhang, M. & Wang, W. 2003. Organization of signaling complexes by PDZ-domain scaffold proteins. *Acc Chem Res*, 36, 530-8.

Zhang, S., Taghibiglou, C., Girling, K., Dong, Z., Lin, S. Z., Lee, W., Shyu, W. C. & Wang, Y. T. 2013b. Critical role of increased PTEN nuclear translocation in excitotoxic and ischemic neuronal injuries. *J Neurosci*, 33, 7997-8008.

Zhang, S. J., Steijaert, M. N., Lau, D., Schutz, G., Delucinge-Vivier, C., Descombes, P. & Bading, H. 2007. Decoding NMDA Receptor Signaling: Identification of Genomic Programs Specifying Neuronal Survival and Death. *Neuron*, 53, 549-62.

Zhang, S. J., Zou, M., Lu, L., Lau, D., Ditzel, D. A., Delucinge-Vivier, C., Aso, Y., Descombes, P. & Bading, H. 2009. Nuclear calcium signaling controls expression of a large gene pool: identification of a gene program for acquired neuroprotection induced by synaptic activity. *PLoS Genet*, 5, e1000604.

Zhang, Y., Matt, L., Patriarchi, T., Malik, Z. A., Chowdhury, D., Park, D. K., Renieri, A., Ames, J. B. & Hell, J. W. 2014a. Capping of the N-terminus of PSD-95 by calmodulin triggers its postsynaptic release. *EMBO J*, 33, 1341-53.

Zhang, Z. Y. 2002. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42, 209-34.

Zhao, C., Du, C. P., Peng, Y., Xu, Z., Sun, C. C., Liu, Y. & Hou, X. Y. 2015. The upregulation of NR2A-containing N-methyl-D-aspartate receptor function by tyrosine phosphorylation of postsynaptic density 95 via facilitating Src/proline-rich tyrosine kinase 2 activation. *Mol Neurobiol*, 51, 500-11.

Zhou, L., Li, F., Xu, H. B., Luo, C. X., Wu, H. Y., Zhu, M. M., Lu, W., Ji, X., Zhou, Q. G. & Zhu, D. Y. 2010. Treatment of cerebral ischemia by disrupting ischemia-induced interaction of nNOS with PSD-95. *Nat Med*, 16, 1439-43.

Zhou, L. & Zhu, D. Y. 2009. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*, 20, 223-30.

Zhou, X., Hollern, D., Liao, J., Andrechek, E. & Wang, H. 2013. NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors. *Cell Death Dis*, 4, e560.

Zhu, J., Shang, Y. & Zhang, M. 2016. Mechanistic basis of MAGUK-organized complexes in synaptic development and signalling. *Nat Rev Neurosci*, 17, 209-23.

ANEXOS

Durante la realización de su Tesis Doctoral, Sara Ayuso Dolado ha contribuido al desarrollo de otros proyectos del laboratorio. Así, ha participado en la caracterización de los mecanismos que alteran la función de otras proteínas prosupervivencia durante la excitotoxicidad y la isquemia cerebral, como son el receptor de neurotrofinas TrkB y su proteína interaccionante Kidins220/ARMS. Fruto de este trabajo son dos patentes que tratan de proteger intelectualmente los péptidos neuroprotectores desarrollados, respectivamente, TFL₄₅₇ y Tat-K:

Inventores: Díaz-Guerra, M., Tejeda, G.S., Vidaurre, O.G. y Ayuso, S.

TÍTULO: Péptido neuroprotector que aumenta la estabilidad de la proteína TrkB-FL en excitotoxicidad así como su uso en el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares y otras patologías del SNC

Nº DE SOLICITUD: P201431507 y PCT/ES2015/070744 PAÍS DE PRIORIDAD: España

FECHA DE PRIORIDAD: 14-10-2014 y 14-10-2015 para la solicitud PCT

ENTIDAD TITULAR: CSIC/UAM

PAISES A LOS QUE SE HA EXTENDIDO: Oficina Española de Patentes y Marcas

Inventores: Díaz-Guerra, M.*, Iglesias, T.*, López-Menéndez, C., Gamir-Morralla, A., Ayuso, S. and Tejeda, G.S. (**equal contribution*).

TÍTULO: Péptido neuroprotector que aumenta la estabilidad de la proteína Kidins220 en excitotoxicidad así como su uso en el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares y otras patologías del SNC

Nº DE SOLICITUD: P201530118 PAÍS DE PRIORIDAD: España

FECHA DE PRIORIDAD: 30-01-2015

ENTIDAD TITULAR: CSIC/UAM

PAISES A LOS QUE SE HA EXTENDIDO: Oficina Española de Patentes y Marcas

También ha publicado los trabajos:

- Gamir-Morralla, A.#, López-Menéndez, C.#, Ayuso-Dolado, S., Tejeda, G.S., Montaner, J., Rossell, A., Iglesias, T.* and Díaz-Guerra, M.* Development of a neuroprotective peptide that preserves survival pathways by preventing Kidins220/ARMS calpain processing induced by excitotoxicity. *Cell Death and Disease* 6:e1939 (2015)
- Tejeda, G.S., Ayuso-Dolado, S., Arbeteta, R., Esteban-Ortega, G.M., Vidaurre, O.G. and Díaz-Guerra, M. Brain ischemia induces shedding of a BDNF-scavenger ectodomain from TrkB receptors by excitotoxicity-activation of metalloproteinases and γ -secretases. *J. Pathol.* 238, 627-640 (2016)
- Pazo, A., Pérez-González, A., Ayuso-Dolado, S., Oliveros, J.C., Huarte, M., Díaz-Guerra, M., Goda, Y. and Nieto A. hCLE/C14orf166 is a translational activator present in neuronal RNAtransporting granules that binds cap structures differentially in distinct neuronal compartments. *Nucleic Acids Res.* (*submitted*)



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201431507	
Fecha de recepción:	14 octubre 2014, 15:36 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	ES1641.1018	
Solicitante:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)	
Número de solicitantes:	2	
País:	ES	
Título:	PÉPTIDO NEUROPROTECTOR QUE AUMENTA LA ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA TRKB-FL EN EXCITOTOXICIDAD ASÍ COMO SU USO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES Y OTRAS PATOLOGÍAS DEL SNC	
Documentos enviados:	Descripción.pdf (39 p.) Reivindicaciones-1.pdf (2 p.) Dibujos-1.pdf (7 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip FEERCPT-1.pdf (1 p.) SEQLPDF.pdf (8 p.) SEQLTXT.txt	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=ENTIDAD PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL - CIF B84921709 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J,OU=703015345,OU=fnmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es	
Fecha y hora de recepción:	14 octubre 2014, 15:36 (CEST)	
Codificación del envío:	10:E5:CD:36:86:1D:A1:F5:50:B7:27:2A:4E:C1:9B:4C:8B:83:FD:B2	



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION <input checked="" type="checkbox"/> ADICION A LA PATENTE EUROPEA <input type="checkbox"/> ADICION A LA PATENTE ESPAÑOLA <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA <input type="checkbox"/> PCT: ENTRADA FASE NACIONAL <input type="checkbox"/>	
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
4) LUGAR DE PRESENTACION:		OEPM, Presentación Electrónica
(5-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACION SOCIAL: UNIVERSIDAD PÚBLICA NACIONALIDAD: CODIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CODIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CODIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCION DEL DERECHO: INVENCION LABORAL: CONTRATO: SUCESION: PORCENTAJE DE TITULARIDAD:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) <input type="checkbox"/> España ES Q2818002D C/ Serrano, 117 Madrid 28 Madrid 28006 España ES <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 050,00 %
(5-2) SOLICITANTE 2:	DENOMINACION SOCIAL: UNIVERSIDAD PÚBLICA NACIONALIDAD: CODIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CODIGO POSTAL:	UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID <input checked="" type="checkbox"/> España ES Q2818013A Ciudad Universitaria de Cantoblanco. Pabellón C.C/ Einstein nº 3 Madrid 28 Madrid 28049



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201530118	
Fecha de recepción:	30 enero 2015, 09:47 (CET)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	ES1641.1014	
Solicitante:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)	
Número de solicitantes:	2	
País:	ES	
Título:	PÉPTIDO NEUROPROTECTOR QUE AUMENTA LA ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA KIDINS220 EN EXCITOTOXICIDAD ASÍ COMO SU USO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES Y OTRAS PATOLOGÍAS DEL SNC	
Documentos enviados:	Descripción.pdf (36 p.) Reivindicaciones-1.pdf (2 p.) Dibujos-1.pdf (6 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip FEERCPT-1.pdf (1 p.) SEQLPDF.pdf (5 p.) SEQLTXT.txt	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=ENTIDAD PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL - CIF B84921709 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J,OU=703015345,OU=fnmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es	
Fecha y hora de recepción:	30 enero 2015, 09:47 (CET)	
Codificación del envío:	E2:FA:46:F5:C3:C0:8C:BB:0F:70:2E:98:0E:A8:4E:E6:95:0E:25:2C	



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION <input checked="" type="checkbox"/> ADICION A LA PATENTE EUROPEA <input type="checkbox"/> ADICION A LA PATENTE ESPAÑOLA <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA <input type="checkbox"/> PCT: ENTRADA FASE NACIONAL <input type="checkbox"/>	
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
4) LUGAR DE PRESENTACION:		OEPM, Presentación Electrónica
(5-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACION SOCIAL: UNIVERSIDAD PÚBLICA NACIONALIDAD: España CODIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE: Q2818002D CNAE: PYME: DOMICILIO: C/ Serrano, 117 LOCALIDAD: Madrid PROVINCIA: 28 Madrid CODIGO POSTAL: 28006 PAÍS RESIDENCIA: España CODIGO PAÍS: ES TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: INVENCION LABORAL: <input checked="" type="checkbox"/> CONTRATO: <input type="checkbox"/> SUCESIÓN: <input type="checkbox"/> PORCENTAJE DE TITULARIDAD: 050,00 %	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) <input type="checkbox"/> España ES Q2818002D C/ Serrano, 117 Madrid 28 Madrid 28006 España ES <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 050,00 %
(5-2) SOLICITANTE 2:	DENOMINACION SOCIAL: UNIVERSIDAD PÚBLICA NACIONALIDAD: España CODIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE: Q2818013A CNAE: PYME: DOMICILIO: Ciudad Universitaria de Cantoblanco. C/Einstein, 3 LOCALIDAD: Madrid PROVINCIA: 28 Madrid CODIGO POSTAL: 28049 PAÍS RESIDENCIA: España	UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID <input type="checkbox"/> España ES Q2818013A Ciudad Universitaria de Cantoblanco. C/Einstein, 3 Madrid 28 Madrid 28049 España

	CÓDIGO PAÍS: ES TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: INVENCIÓN LABORAL: <input checked="" type="checkbox"/> CONTRATO: <input type="checkbox"/> SUCESIÓN: <input type="checkbox"/> PORCENTAJE DE TITULARIDAD: 050,00 %
(6-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: DÍAZ-GUERRA GONZÁLEZ NOMBRE: MARGARITA NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:
(6-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: IGLESIAS VACAS NOMBRE: TERESA NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:
(6-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: LÓPEZ MENÉNDEZ NOMBRE: CELIA NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:
(6-4) INVENTOR 4:	APELLIDOS: GAMIR MORRALLA NOMBRE: ANDREA NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:
(6-5) INVENTOR 5:	APELLIDOS: AYUSO DOLADO NOMBRE: SARA NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:
(6-6) INVENTOR 6:	APELLIDOS: SÁNCHEZ TEJEDA NOMBRE: GONZALO NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:
(7) TÍTULO DE LA INVENCION:	PÉPTIDO NEUROPROTECTOR QUE AUMENTA LA ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA KIDINS220 EN EXCITOTOXICIDAD ASÍ COMO SU USO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES Y OTRAS PATOLOGÍAS DEL SNC
(8) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>
(9) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>

Development of a neuroprotective peptide that preserves survival pathways by preventing Kidins220/ARMS calpain processing induced by excitotoxicity

A Gamir-Morralla^{1,2,4}, C López-Menéndez^{1,2,4}, S Ayuso-Dolado¹, GS Tejada¹, J Montaner³, A Rosell³, T Iglesias^{*,1,2,5} and M Díaz-Guerra^{*,1,5}

Kinase D-interacting substrate of 220 kDa (Kidins220), also known as ankyrin repeat-rich membrane spanning (ARMS), has a central role in the coordination of receptor crosstalk and the integration of signaling pathways essential for neuronal differentiation, survival and function. This protein is a shared downstream effector for neurotrophin- and ephrin-receptors signaling that also interacts with the *N*-methyl-D-aspartate type of glutamate receptors (NMDARs). Failures in neurotrophic support and glutamate signaling are involved in pathologies related to excitotoxicity and/or neurodegeneration, where different components of these dynamic protein complexes result altered by a combination of mechanisms. In the case of Kidins220/ARMS, overactivation of NMDARs in excitotoxicity and cerebral ischemia triggers its downregulation, which contributes to neuronal death. This key role in neuronal life/death decisions encouraged us to investigate Kidins220/ARMS as a novel therapeutic target for neuroprotection. As the main mechanism of Kidins220/ARMS downregulation in excitotoxicity is proteolysis by calpain, we decided to develop cell-penetrating peptides (CPPs) that could result in neuroprotection by interference of this processing. To this aim, we first analyzed in detail Kidins220/ARMS cleavage produced *in vitro* and *in vivo*, identifying a major calpain processing site in its C-terminal region (between amino acids 1669 and 1670) within a sequence motif highly conserved in vertebrates. Then, we designed a 25-amino acids CPP (Tat-K) containing a short Kidins220/ARMS sequence enclosing the identified calpain site (amino acids 1668–1681) fused to the HIV-1 Tat protein basic domain, able to confer membrane permeability to attached cargoes. Transduction of cortical neurons with Tat-K reduced Kidins220/ARMS calpain processing in a dose- and time-dependent manner upon excitotoxic damage and allowed preservation of the activity of pERK1/2 and pCREB, signaling molecules central to neuronal survival and functioning. Importantly, these effects were associated to a significant increase in neuronal viability. This Kidins220/ARMS-derived peptide merits further research to develop novel neuroprotective therapies for excitotoxicity-associated pathologies.

Cell Death and Disease (2015) 6, e1939; doi:10.1038/cddis.2015.307; published online 22 October 2015

Neurotransmitters and neurotrophins regulate nervous system development, and preservation and remodeling of adult neural circuits. Prominent roles are played by glutamate, major excitatory neurotransmitter, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). By activating their receptors and signaling pathways, these ligands regulate multiple neuronal processes, including survival. Physiological stimulation of *N*-methyl-D-aspartate type of glutamate receptors (NMDARs) induces neuronal survival through extracellular signal-regulated kinases (ERKs) activation,¹ antioxidant defenses induction,² and cAMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation.³ In turn, CREB increases expression

of BDNF^{4,5} and its receptor tropomyosin-related kinase B (TrkB).^{6,7} Neurotrophin receptors enhance neuronal survival via signaling cascades involving PI3K-Akt, ERK,^{8,9} CREB¹⁰ and nuclear factor kappa-B (NF-κB).¹¹ Signaling requires large complexes formed at postsynaptic membranes by receptors and effectors. For instance, NMDAR association with ephrin receptor (Eph)B is critical for synaptic function,^{12,13} while EphB activation by ephrin-B modulates NMDAR-dependent calcium influx and receptor expression.¹⁴ Likewise, TrkB interacts with ephrin-A7 and EphA.^{15,16} In addition, Fyn tyrosine-kinase associates to TrkB and NMDAR-GluN2B,^{17,18} while neural Shc (N-Shc), a neurotrophin signaling adaptor,

¹Department of Endocrine and Nervous System Physiopathology, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM), Madrid 28029, Spain; ²CIBERNED, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain and ³Neurovascular Research Laboratory, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Neurovascular Unit, Department of Neurology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

*Corresponding author: T Iglesias or M Díaz-Guerra, Department of Endocrine and Nervous System Physiopathology, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (CSIC-UAM), C/ Arturo Duperier, 4, Madrid 28029, Spain. Tel: +34 915854487 or +34 915854443; Fax: +34 915854401; E-mail: tigilesias@iib.uam.es or mdiazguerra@iib.uam.es

⁴These authors contributed equally to this work.

⁵These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: ARMS, ankyrin repeat-rich membrane spanning; BBB, blood-brain barrier; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BDPs, breakdown products; CIII, calpain-specific inhibitor III; CPP, cell-penetrating peptide; CREB, cAMP response element-binding protein; DIVs, days *in vitro*; dMCAO, distal occlusion of the middle cerebral artery; Eph, ephrin receptor; ERKs, extracellular signal-regulated kinases; Kidins220, Kinase D-interacting substrate of 220 kDa; NMDARs, *N*-methyl-D-aspartate type of glutamate receptors; PDZ-L, Postsynaptic density-95, Discs Large A and Zonula occludens-1 ligand; Trk, tropomyosin-related kinase

Received 03.6.15; revised 19.8.15; accepted 14.9.15; Edited by D Bano

Brain ischaemia induces shedding of a BDNF-scavenger ectodomain from TrkB receptors by excitotoxicity activation of metalloproteinases and γ -secretases

Gonzalo S Tejada, Sara Ayuso-Dolado, Raquel Arbeteta, Gema M Esteban-Ortega, Oscar G Vidaurre† and Margarita Díaz-Guerra*

Instituto de Investigaciones Biomédicas 'Alberto Sols', Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM), Madrid, Spain

*Correspondence to: M Díaz-Guerra, Department of Endocrine and Nervous System Physiopathology, Instituto de Investigaciones Biomédicas 'Alberto Sols' (CSIC-UAM), Arturo Duperier, 4, Madrid 28029, Spain. E-mail: mdiazguerra@iib.uam.es

†Present address: Department of Neuroscience and Friedman Brain Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA.

Abstract

Stroke remains a leading cause of death and disability in the world with limited therapies available to restrict brain damage or improve functional recovery after cerebral ischaemia. A promising strategy currently under investigation is the promotion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) signalling through tropomyosin-related kinase B (TrkB) receptors, a pathway essential for neuronal survival and function. However, TrkB and BDNF-signalling are impaired by excitotoxicity, a primary pathological process in stroke also associated with neurodegenerative diseases. Pathological imbalance of TrkB isoforms is critical in neurodegeneration and is caused by calpain processing of BDNF high affinity full-length receptor (TrkB-FL) and an inversion of the transcriptional pattern of the *Ntrk2* gene, to favour expression of the truncated isoform TrkB-T1 over TrkB-FL. We report here that both TrkB-FL and neuronal TrkB-T1 also undergo ectodomain shedding by metalloproteinases activated after ischaemic injury or excitotoxic damage of cortical neurons. Subsequently, the remaining membrane-bound C-terminal fragments (CTFs) are cleaved by γ -secretases within the transmembrane region, releasing their intracellular domains (ICDs) into the cytosol. Therefore, we identify TrkB-FL and TrkB-T1 as new substrates of regulated intramembrane proteolysis (RIP), a mechanism that highly contributes to TrkB-T1 regulation in ischaemia but is minor for TrkB-FL which is mainly processed by calpain. However, since the secreted TrkB ectodomain acts as a BDNF scavenger and significantly alters BDNF/TrkB signalling, the mechanism of RIP could contribute to neuronal death in excitotoxicity. These results are highly relevant since they reveal new targets for the rational design of therapies to treat stroke and other pathologies with an excitotoxic component.

Copyright © 2015 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: TrkB; excitotoxicity; ischaemia; metalloproteinases; γ -secretases; stroke

Received 6 November 2015; Revised 2 December 2015; Accepted 20 December 2015

No conflicts of interest were declared.

Introduction

Stroke is a leading cause of mortality, adult disability, and dementia. However, therapies for ischaemic stroke are limited to thrombolytic drugs, administered only very early after stroke onset and contraindicated for haemorrhagic stroke and other frequent medical conditions. New treatments are being developed to restrict brain damage and improve functional recovery by reducing the secondary neuronal death in regions surrounding the infarct where excitotoxicity is a primary pathological mechanism. This form of neuronal death is induced by overstimulation of the NMDA type of glutamate receptors (NMDARs) and, interestingly, also contributes to

neurodegeneration in other acute disorders (trauma, epilepsy) or chronic diseases (Alzheimer's, Parkinson's or Huntington's) [1]. An alternative neuroprotective strategy is promotion of neuronal survival by treatment with neurotrophins [2,3], mostly brain-derived neurotrophic factor (BDNF). However, aberrant BDNF signalling through tropomyosin-related kinase B (TrkB) receptors has been described in excitotoxicity [4,5], Alzheimer's disease (AD) [6,7], other neurodegenerative diseases (NDDs) [8,9], and stroke [4]. Thus, a rational design of neuroprotective therapies for excitotoxicity-associated pathologies requires an in-depth characterization of the processes responsible for impaired BDNF/TrkB signalling.

hCLE/C14orf166 is a translational activator present in neuronal RNA-transporting granules that binds cap structures differentially in distinct neuronal compartments

Alejandra Pazo^{1,2}, Alicia Pérez-González^{1,2}, Sara Ayuso³, Juan Carlos Oliveros¹, Maite Huarte⁴, Margarita Diaz-Guerra³, Yukiko Goda⁵ and Amelia Nieto^{1,2,*}

¹Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Darwin 3, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

²CIBER de Enfermedades Respiratorias CIBERES, Spain

³Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (IIBM-CSIC), Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain

⁴Center for Applied Medical Research (CIMA), Department of Gene Therapy and Regulation of Gene Expression, University of Navarra, IdiSNA, Avda Pio XII 55, 31008 Pamplona, Spain

⁵Brain Science Institute, RIKEN, Saitama 351-0198, Japan

*Corresponding author: Amelia Nieto, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Darwin 3, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Telephone: [+34] 91 5854914

Fax: [+34] 91 5854506

E-mail: anieto@cnb.csic.es

Abstract

hCLE/C14orf166 is a component of neuronal RNA-transporting granules involved in localized translation. hCLE associates to DDX1, HSPC117 and FAM98B in HEK293T cells, and all four proteins from HEK293T and primary neuron cultures or rat brain total extracts bind to cap analog-containing resins. hCLE silencing reduces its accumulation and that of its interacting proteins and decreases protein translation in HEK293T cells. Purified hCLE free of its associated proteins bound cap with low affinity; hCLE is thus a cap-binding protein whose cap association is probably modulated by its interacting proteins. hCLE is present in active neuronal synapses and hCLE, but not its interacting proteins, is enriched in synaptosome fractions. Accordingly, the synaptic hCLE protein lacks cap-binding activity. This hCLE cap-binding activity, as well as high-throughput sequencing and characterization of hCLE-associated RNA suggest an important role for hCLE in modulating neuronal RNA traffic and expression in localized translation in the central nervous system.

INTRODUCTION

hCLE/C14orf166, is a 27 kDa protein with both nuclear and cytoplasmic localization (1), which modulates different phases of RNA metabolism. In the nuclear compartment, it is a component of complexes involved in transcription-related functions such as the human spliceosome (2), the 7SK snRNA methylphosphate capping complex (3),

and the tRNA-splicing ligase complex (4). hCLE has also an important role in the influenza virus life cycle, as it interacts with the viral polymerase (1), positively modulates viral multiplication (5) and is incorporated into influenza virus particles (6). In neurons, hCLE is found in mRNA-containing kinesin-associated granules in dendrites (7) as well as in the developing brain, as a component of cytosolic, ribosome-containing RNA granules that transport specific mRNAs from the cell body to the dendrites, to allow local