



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Intervención sobre la señalización de receptores extrasinápticos y sinápticos de N-metil-D-aspartato en la muerte neuronal excitotóxica

Verónica Guirao Salguero

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Intervención sobre la señalización de receptores extrasinápticos y sinápticos de N-metil-D-aspartato en la muerte neuronal excitotóxica

Verónica Guirao Salguero

TESIS DOCTORAL

Badalona, 2015

Memoria presentada para optar al título de Doctora por la Universitat de
Barcelona

Trabajo dirigido por la Dra. Teresa Gasull y el Dr. Antoni Dávalos

Programa de Doctorado en Biomedicina



**UNIVERSITAT DE
BARCELONA**



Fundació Institut d'Investigació en
Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol

Programa de Doctorado en Biomedicina
Facultad de Medicina
Universidad de Barcelona

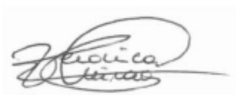
Intervención sobre la señalización de receptores extrasinápticos y sinápticos de N-metil-D-aspartato en la muerte neuronal excitotóxica

Memoria presentada por Verónica Guirao Salguero para optar al grado de
doctor por la Universitat de Barcelona

Grupo de Investigación en Neurobiología Celular i Molecular
Departament de Neurociències
Fundació d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol


Badalona, 30 de Octubre de 2015

Doctoranda



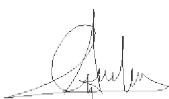
Verónica Guirao Salguero

Directora de tesis



Teresa Gasull Dalmau

Director de tesis



Antoni Dávalos Errando

Tutor de tesis



Josep Saura Martí

Este trabajo de tesis doctoral ha sido posible gracias al programa FPI (BES-2008-006366), a la financiación de los proyectos SAF-2007-62559 y SAF2010-22122 del Ministerio de Educación y Ciencia, a AGAUR 2009 SGR39 y 2014 SGR1670 de la Generalitat de Catalunya, así como a la financiación de la RED NEUROVASCULAR (RENEVAS) RD06-026/0013 e INVITUS RD12/0014/0008 del Instituto Carlos III del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Nobody said it was easy
"The Scientist" Coldplay

Nadie está a salvo de las derrotas. Pero es mejor perder algunos combates en la lucha por nuestros sueños, que ser derrotado sin saber siquiera por qué se está luchando

Paulo Coelho

A mis padres,

A Alejandro,

A mis abuelos,

A VICENÇ,

AGRADECIMIENTOS

Ja fa 8 anys que vaig arribar per primer cop a l'IGTP, davant meu s'obria una nova etapa que em feia una mica de por però que a la vegada iniciava amb molta il·lusió. Què poc imaginava llavors tot el que viuria durant els següents anys! Després de les pràctiques de la carrera van venir les del màster, i quasi sense adonar-me em vaig trobar submergida en l'apassionant i esgotador món de la tesis doctoral. Ara que tanco aquesta etapa, em venen al cap tots aquells que han estat al meu costat i m'han ajudat en aquest camí que no sempre ha estat fàcil.

En primer lloc voldria agrair als meus directors de tesis, l'Antoni Dávalos i la Teresa Gasull per tot el que han fet per mi aquests anys. Antoni, moltes gràcies pel teu recolzament durant tot aquest procés i per la teva gran capacitat de transmetre coneixement. Tere, m'agradaria agrair-te el fet que hagis apostat per mi. Encara recordo aquella trucada de fa 8 anys en la que em vas oferir formar part d'aquest grup d'investigació. Gràcies per orientar-me en els moments difícils i per implicar-te tant en aquests projectes que ara formen part de la meva tesi.

Octavi, gràcies per la teva inesgotable col·laboració en aquest treball. Per les xerrades científiques i les no-científiques, per ajudar-me a treure el màxim profit de les petites victòries. També agrair al Dr. Josep Saura per la seva col·laboració a l'actuar com a tutor i per estar sempre disponible quan l'he necessitat. Agrair també a les neuròlogues de la unitat; Mònica, Meritxell i Natàlia, gràcies per les estones que hem compartit i per tot el que he pogut aprendre de vosaltres.

No podria oblidar-me de les meves compis de grup, la Jovita i la Núria. Jovi, gracies per acollir-me com ho vas fer quan vaig aterrar per primer cop al laboratori, per la teva paciència i per haver estat al meu costat quan ho he necessitat. Sempre recordaré les nostres nits de noies a les habitacions d'hotel, quan després d'un llarg dia de congrés ens estiràvem i compartíem els últims cotilleos. *Amija* Núria, agrair-te tots els teus consells i que sempre hagis estat disponible per respondre les meves innumerables preguntes. Gràcies també per recolzar-me i animar-me quan les coses no han anat bé...*La la là!* No canviïs mai!

Amijos...què puc dir de vosaltres! Heu estat una part molt important d'aquest llarg procés. Les nits de karaoke cantant "amijo mio" formaran sempre part de la nostra història. Eudald, els nostres sopars comentant les "novetats" del laboratori han de seguir per sempre! Gràcies per estar al meu costat i per ajudar-me sempre que ho he necessitat. Això de la tesi sí que és un bon *fill!* Arce, *gran company de feina* :), gràcies pel teu recolzament en els moments difícils, pel teu bon humor i per les bones rises que ens hem fet tots junts! Lucía, ha sido genial haber podido compartir contigo casi desde el principio esta etapa, las barbacoas en tu terraza y los cotilleos! Agrair també als que ja no estan al lab com l'Alba, que tot i que està lluny sempre troba una estoneta per fer un soparet. A les noves incorporacions a l'exclusiu grup d'Amijos, Anna i Kerry, gracies pels ànims que m'heu donat en aquesta última època!

També a la resta de companys que han estat al voltant durant aquests anys i amb els que he pogut compartir molt bones estones. Vio, Gemma, Marc, Quim, Marina, Sara, Eva, Pepe, Ramón, Josep. Amb gent com vosaltres al costat la feina es fa molt més fàcil!

Vull agrair també als meus nous companys de plataformes, gràcies per acollir-me com ho heu fet i ajudar-me durant aquest primer any junts! Gràcies Eurne per l'oportunitat que m'has ofert i per ser com ets! Es un plaer treballar amb tu! Laia, gràcies per la teva energia i per recolzar-me com ho has fet. Aquests últims mesos hem compartit l'estrès per les noves tasques i amb tu al costat tot ha sigut molt més fàcil! Marco, agradezco tu apoyo y ayuda en todo lo que he necesitado. M'agradaria també agrair a la Pilar i al Gerard la seva inestimable ajuda amb la microscòpia, pels coneixements que han compartit i les hores que hem passat mirant neurones a la pantalla!

No puc deixar d'agair a dues persones que han estat molt importants en el meu dia a dia del laboratori. Maribel i Emmy, gràcies per les estones compartides i per ajudar-me les mil vegades al dia que baixo a demanar-vos coses! Gràcies Emmy


per enviar-me a casa cada tarda per escriure aquesta tesis, per ser una mica la mami del lab!

Gemma!!!! Nos conocemos desde el cole y desde entonces siempre he podido contar contigo! Nuestros batidos de chocolate y nuestras cenas en el *Mira* han sido y serán siempre una parte esencial en mi vida. Gracias por tus consejos y tu constante apoyo! ☺

Agrair també a una parelleta molt especial, Guille i Sara, que tot i que fa relativament poquet que formen part de la meva vida, en poc temps s'han convertit en persones molt importants per mi! Gràcies per les barbacoes compartides, per les nits de mojito intentant decidir on és necessari un bon *forat!* Sé que encara tenim per endavant molts moments inoblidables, començant per un casament! :). No canviu mai i seguiu estimant-vos com ho feu!

I com no agrair al Jordi Forcadell, que ha aportat la part artística a la portada d'aquesta tesis. Gràcies per evitar que acabés tornant-me boja batallant amb el photoshop!

A mi familia, mil gracias! A mis abuelos, los que están y los que me cuidan desde arriba, les agradezco todo lo que me han dado, todo lo que me quieren aunque no siempre haya podido dedicarles el tiempo que se merecen. A mis padres...vosotros sois los principales responsables de la persona que soy ahora. Gracias por vuestra confianza, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado, ya fueran o no las correctas. Por celebrar conmigo los logros y por estar a mi lado cuando las cosas no han funcionado. Gracias por vuestro amor incondicional! Sin vosotros no habría conseguido llegar hasta este momento. A mi hermanito, simplemente decirte que no todo el mundo tiene la suerte de tener a alguien como tú a su lado. Gracias por ser como eres, por estar siempre a mi lado! Sé que siempre puedo contar contigo!!

I per acabar, agrair a la persona amb la que comparteixo la meva vida. Vicenç, hi ha moltes coses que admiro de tu; entre elles la teva capacitat d'implicació en tot allò que et proposes, el teu positivisme quan el meu falla, les teves ganes de millorar dia a dia. No oblidis mai que vals moltíssim! Finalment s'ha complert el que tant em repeties...*ànims que ja acabes!* Has sigut la persona que més temps ha tingut que suportar-me durant la fase d'escriptura d'aquesta tesi, gràcies per no sortir corrents! Per estar sempre al meu costat, recolzant-me i animant-me tots els dies, encara que moltes vegades no hagi sigut fàcil. A tu vull dedicar-te aquesta tesi, ets el gran responsable de que per fi hagi arribat aquest moment, sense tu això no seria possible. T'estimo! 

Kelly, Lucky, gracias por vuestro cariño! Sin vuestra constante compañía y ganas de disfrutar, la vida sería menos divertida! :)

Moltes gràcies a tots per acompanyar-me en aquest camí!

GLOSARIO

Glosario

aa	aminoácidos
4-HNE	hydroxynonenal
ACN	acetonitrilo
AIT	ataque isquémico transitorio
AMPA <i>receptor</i>	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
ATV	atorvastatina
BCA	ácido bicinconínico
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BSA	albúmina sérica bovina
CaM	<i>calmodulin</i>
CaN	<i>calcineurin</i>
CaMKII	<i>Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II</i>
Ca ²⁺	ión calcio
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CK2	<i>casein kinase 2</i>
CNQX	<i>6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione</i>
COX-2	<i>cyclooxygenase-2</i>
CO ₂	dióxido de carbono
Co-IP	co-inmunoprecipitación
Co-IP-DAPK1	co-inmunoprecipitación con anticuerpo anti-DAPK1 o co-inmunoprecipitado obtenido con anticuerpo anti- DAPK1
CRE	<i>cAMP response elements</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRMP2	<i>collapsin response mediator protein 2</i>
D-AP5	<i>(2R)-amino-5-phosphonovaleric acid</i>
DAPK1	<i>death-associated protein kinase 1</i>
Db-Ab	complejo dynabeads - anticuerpo
DIV	<i>days in vitro</i> , días <i>in vitro</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxiribonucleico
DTT	ditiotreitól
EDTA	<i>ethylenediamide tetraacetic acid</i>
ERKs	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

FSC	flujo sanguíneo cerebral
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i>
GAD65/67	<i>glutamate decarboxylase isoforms 65/67</i>
GIPC	<i>GAIP-interacting protein, C terminus</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
h	horas
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
K ⁺	ión potasio
kDa	kilodaltons
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry</i>
MAGUKs	<i>membrane-associated guanylate kinases</i>
MAP-2	<i>microtubule-associated protein 2</i>
MCA	<i>middle cerebral artery</i> , arteria cerebral media
MCAO	<i>middle cerebral artery occlusion</i> , oclusión de la arteria cerebral media
mg	miligramo
Mg ²⁺	ión magnesio
min	minutos
ml	mililitro
MMPs	<i>matrix metalloproteinases</i>
Na ⁺	ión sodio
NCX	<i>Na⁺/Ca²⁺ exchanger</i> , intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartic acid</i>
NMDARs	<i>N-methyl-D-aspartate receptors</i> , Receptores de glutamato de tipo NMDA
NMDARs-NR2A	Receptores de glutamato de tipo NMDA formados por la subunidad NR2A
NMDARs-NR2B	Receptores de glutamato de tipo NMDA formados por la subunidad NR2B
NO	<i>nitric oxide</i>
NOS	<i>nitric oxide synthase</i>
nNOS	<i>neuronal nitric oxide synthase</i>
O ₂	oxígeno
o-ATV	<i>ortho-hydroxy atorvastatin</i> , metabolito de ATV
OGD	privación de oxígeno y glucosa
OGD/R	privación de oxígeno y glucosa + fase de reoxigenación y retorno de glucosa, correspondiente a la fase de perfusión <i>in vivo</i>
ON	overnight
p-ATV	<i>para-hydroxy atorvastatin</i> , metabolito de ATV

pCREB	cAMP response element-binding protein, Ser133
PBS	phosphate buffer saline
PKC	<i>protein kinase C</i>
PMSF	phenilmethilsulfonil fluor
PP1	<i>protein phosphatase 1</i>
PP2A	<i>protein phosphatase 2A</i>
PSD	<i>postsynaptic density</i> , densidad postsináptica
PSD95	<i>postsynaptic density-95</i>
PVDF-LF	polyvinylidene fluoride – low fluorescence
R	fase de reoxigenación y retorno de glucosa, correspondiente a la fase de reperfusión <i>in vivo</i>
RE	retículo endoplasmático
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , especies reactivas de oxígeno
rTPA	<i>recombinant tissue plasminogen activator</i> , activador tisular del plasminógeno recombinante
SNC	sistema nervioso central
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TA	temperatura ambiente
TBS	tampon tris (Tris Buffer Saline)
tMCAO	oclusión transitoria de la arteria cerebral media
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TTX	tetrodotoxina
WB	western blot
PI	<i>propidium iodide</i> , yoduro de propidio
µg	microgramo
µl	microlitro

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ICTUS	3
1.1. Definición	3
1.2. Epidemiología	3
1.3. Factores de riesgo	4
1.4. Clasificación	5
1.5. Fisiopatología de la isquemia cerebral	6
1.5.1. Fallo energético	8
1.5.2. Excitotoxicidad	9
1.5.3. Calcio intracelular	9
1.5.4. Estrés oxidativo	10
1.5.5. Inflamación	11
1.5.6. Expresión génica	12
1.5.7. Muerte neuronal: necrosis / apoptosis / autofagia	12
1.6. Tratamiento del ictus isquémico agudo	14
1.6.1. Trombolisis / Trombectomía	15
1.6.2. Neuroprotección	16
1.6.3. Neurorreparación	17
2. RECEPTORES DE GLUTAMATO; NMDARs	17
2.1. Estructura de los receptores de NMDA	18
2.1.1. Subunidad NR1	21
2.1.2. Subunidad NR2	22
2.1.3. Subunidad NR3	24
2.2. NMDARs sinápticos y extrasinápticos	25
2.2.1. Localización	25
2.2.2. Señalización	27
2.2.3. Vías de señalización diferenciales entre NMDARs sinápticos y extrasinápticos: papel sobre CREB	30

2.2.4.	Moduladores del extremo C-terminal de las subunidades NR2A y NR2B.....	35
2.3.	Antagonistas de los NMDARs.....	43
3.	PROTEÍNAS DE UNIÓN ESPECÍFICA O PREFERENTE A NR2B, SIN INTERACCIÓN CON NR2A	49
3.1.	DAPK1.....	50
3.1.1.	Localización.....	50
3.1.2.	Estructura.....	51
3.1.3.	Funciones.....	52
3.1.4.	DAPK1 e isquemia cerebral	53
3.1.5.	Moléculas que interaccionan con DAPK1	56
3.2.	GIPC	62
4.	ESTATINAS Y SEÑALIZACIÓN DE pCREB.....	63
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....		67
5.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	69
5.1.	PARTE 1: Intervención sobre los NMDARs sinápticos.....	69
5.2.	PARTE 2: Intervención sobre los NMDARs extrasinápticos	69
METODOLOGÍA.....		71
6.	METODOLOGÍA COMÚN PARA LAS PARTES 1 Y 2	73
6.1.	Cultivo primario de neuronas corticales	73
6.2.	Privación de Oxígeno y Glucosa <i>in vitro</i> + Reperfusión (OGD/R).....	75
6.3.	Determinación de la muerte neuronal.....	77
6.4.	Extracción y determinación de la concentración de proteínas	78
6.4.1.	Extracción de proteínas.....	78
6.4.2.	Determinación de la concentración de proteína.....	79

6.5.	Ensayos de Western Blot (WB).....	79
6.6.	Inmuncitofluorescencia (ICF)	82
6.7.	Análisis estadístico.....	85
7.	METODOLOGÍA ESPECÍFICA PARA LA PARTE 1: Intervención sobre NMDARs sinápticos	86
7.1.	Inducción farmacológica de los niveles de pCREB mediante la activación de NMDARs sinápticos	86
7.1.1.	Pretratamiento para unificar el estado de actividad excitatoria tras la OGD.....	87
7.1.2.	Activación selectiva de los NMDARs sinápticos	88
7.2.	Tratamiento con Atorvastatina o su Metabolito de cultivos neuronales sometidos a OGD/R	91
7.3.	Estudio de los niveles proteicos de CREB y pCREB mediante WB.....	93
7.4.	Estudio de pCREB, GAD65/67 y 4-HNE mediante ICF.....	94
7.5.	Estudio de la colocalización de las subunidades NR2A y NR2B con neurologina.....	97
8.	METODOLOGÍA ESPECÍFICA PARA LA PARTE 2: Intervención sobre NMDARs extrasinápticos	99
8.1.	Modelos animales.....	99
8.1.1.	Oclusión transitoria de la arteria cerebral media (t-MCAO) por ligadura.....	100
8.1.2.	Oclusión transitoria de la arteria cerebral media (t-MCAO) por filamento intraluminal	101
8.2.	Obtención de muestras de membrana plasmática neuronal.	101
8.3.	Estudio de los niveles proteicos de pDAPK1, DAPK1, NR2B y GIPC mediante WB	102
8.4.	Estudio de DAPK1, NR2B y GIPC mediante ICF	103
8.5.	Co-inmunoprecipitación (Co-IP) de los interactomas de DAPK1 y GIPC.....	104

8.6. Estudio de DAPK1 y las proteínas co-inmunoprecipitadas mediante WB	111
8.7. Identificación de proteínas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS)	112
8.7.1. SDS-PAGE + identificación por MS.....	112
8.7.2. Cromatografía líquida acoplada a MS (LC-MS/MS).....	113
Preparación de la muestra para LC-MS/MS.....	113
LC-MS/MS de baja resolución	114
LC-MS/MS de alta resolución	114
8.7.3. Búsqueda en bases de datos e identificación de péptidos.....	115
8.7.4. Cálculo del valor de FoldChange.....	117
RESULTADOS	119
9. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO Y MODELO.....	121
9.1. Caracterización de los cultivos primarios de neuronas corticales.....	121
9.2. Caracterización del modelo de isquemia <i>in vitro</i>	123
9.2.1. Establecimiento del curso temporal de la muerte neuronal inducida por OGD/R.....	124
9.2.2. Determinación del componente glutamatérgico-excitotóxico	125
10. RESULTADOS PARTE 1: Intervención sobre NMDARs sinápticos	126
10.1. Estudio del efecto de la activación de NMDARs sinápticos/CREB al inicio de la fase R sobre neuroprotección	126
10.1.1. Caracterización de los protocolos de activación de NMDARs sinápticos y CREB en cultivos de neuronas corticales en condiciones control.....	126
10.1.2. Efecto de la activación de NMDARs sinápticos/CREB al inicio de la fase R sobre los niveles de pCREB y la muerte neuronal inducida por OGD/R.....	127

10.2.	Establecer un posible tratamiento farmacológico aplicable a la clínica que actúe sobre CREB	130
10.2.1.	Efecto del tratamiento con ATV u o-ATV al inicio de la fase R sobre pCREB en cultivos neuronales sometidos a OGD/R.....	130
10.2.2.	Efecto de la administración de ATV u o-ATV al inicio de la fase R sobre la muerte neuronal inducida por OGD/R.....	134
10.2.3.	Evaluación de un posible efecto antioxidante como mecanismo neuroprotector de o-ATV	138
10.2.4.	Las neuronas de subtipo GABAérgico presentan una mayor riqueza de NMDARs sinápticos.....	140
11.	RESULTADOS PARTE 2: Intervención sobre NMDARs extrasinápticos.....	144
11.1.	Caracterización del efecto de nuestro modelo de OGD/R sobre los niveles, procesamiento proteolítico y fosforilaciones de interés de NR2B, DAPK1 y GIPC	144
11.1.1.	NR2B	145
11.1.2.	DAPK1	147
11.1.3.	GIPC.....	150
11.2.	Obtención de los complejos de proteína asociados a los NMDARs extrasinápticos.....	151
11.2.1.	Caracterización de la técnica de coimmunoprecipitación	151
11.2.2.	Co-immunoprecipitación de proteína extraída de muestra total.....	152
11.2.3.	Co-IP de proteína extraída de muestra de membrana plasmática.....	154
11.2.4.	Análisis de las formas proteolíticas de DAPK1 obtenidas en la Co-IP-DAPK1 de muestra total y de muestra de membrana plasmática...	155
11.3.	Estudio de los complejos coimmunoprecipitados: identificación de posibles candidatos neuroprotectores frente a riesgo excitotóxico	157
11.3.1.	Análisis de las proteínas identificadas por LC-MS/MS con presencia diferencial en el Co-IP-DAPK1 de muestra total.....	157

11.3.2. Análisis de las proteínas identificadas por LC-MS/MS con presencia diferencial en el Co-IP-DAPK1 de muestra de membrana..... 163

11.3.3. Validación por WB de los resultados del estudio proteómico de muestra total por LC-MS/MS para 3 proteínas: NR2B, GIPC y CaMKII 168

DISCUSIÓN..... 171

CONCLUSIONES 193

BIBLIOGRAFÍA 197

INTRODUCCIÓN

1. ICTUS

1.1. Definición

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el accidente cerebrovascular o ictus como el “conjunto de signos clínicos, de inicio brusco y desarrollo rápido, que suponen la presencia de una perturbación en la función cerebral (global o focal) con más de 24 horas de duración sin otro origen aparente que el vascular” (J, 1988). Los síntomas más comunes del ictus son debilidad repentina o entumecimiento de la cara, brazo o pierna en un lado del cuerpo. Otros síntomas incluyen confusión, dificultad para hablar o entender una conversación, dificultad para ver con uno o los dos ojos, dificultad para andar, mareos, pérdida del equilibrio o de la coordinación, dolor de cabeza severo sin causa conocida, desvanecimiento o inconsciencia (World Health Organization, 2015).

1.2. Epidemiología

El ictus constituye una de las principales causas de mortalidad en el mundo industrializado. A nivel mundial supone la tercera causa de muerte después de la enfermedad cardiovascular y el cáncer (Lloyd-Jones et al., 2009; Martínez-Vila et al., 2011), es la primera causa de discapacidad en la población adulta y la segunda de demencia (Lloyd-Jones et al., 2009; Masjuan et al., 2011; Gil de Castro and Gil-Nunez, 2000). Según la American Stroke Association, en 2010 la prevalencia del ictus fue de 33 millones, de los cuales 16,9 millones de personas padecieron un ictus por primera vez (American Stroke Association, 2015). En España la incidencia se estima en 187 casos por 100.000 habitantes y año (Diaz-Guzman et al., 2012). El accidente cerebrovascular es responsable del 10% de la mortalidad global española, y constituye la segunda causa de muerte en la población general, y la primera en mujeres (Diaz-Guzman et al., 2012; N. García-Barragan, 2012).

A nivel hospitalario, el ictus constituye la primera causa de ingreso por enfermedad neurológica grave, y conlleva un coste sanitario elevado (Alvarez

Sabin et al., 2006; Hervas-Angulo et al., 2006). La edad media de los pacientes de ictus es de 73,9 años (Diaz-Guzman et al., 2012), el incremento de la incidencia en mayores de 65 años y el envejecimiento progresivo de la población, hace prever un incremento de la incidencia en los próximos años.

1.3. Factores de riesgo

Los factores de riesgo de padecer un ictus pueden clasificarse en modificables, potencialmente modificables y factores de riesgo no modificables. La prevención primaria del ictus está orientada a la actuación sobre los factores de riesgo modificables y potencialmente modificables; mientras que los no modificables identifican a las personas que tienen un riesgo más elevado de padecer ictus y que se beneficiarían de un control más riguroso de los factores de riesgo modificables.

Entre los factores de riesgo no modificables, la edad es el más importante. En este sentido, la incidencia de ictus se duplica aproximadamente cada 10 años a partir de los 55 años. También se ha observado una mayor incidencia en hombres que en mujeres, en personas de origen afroamericano o hispanoamericano y se han asociado los antecedentes familiares a un mayor riesgo de padecer un ictus (Gil de Castro and Gil-Nunez, 2000; Allen and Bayraktutan, 2008; O'Donnell et al., 2010; Martínez-Vila et al., 2011).

Los factores de riesgo modificables o potencialmente modificables son aquellos sobre los que se puede intervenir para reducir el riesgo de ictus. Entre ellos, la hipertensión arterial es el factor de riesgo modificable más importante (Kjeldsen et al., 2001). Se ha descrito también, un aumento de la incidencia en personas fumadoras (O'Donnell et al., 2010) y un riesgo incrementado en personas diabéticas (Barrett-Connor and Khaw, 1988; Folsom et al., 1999).

El estudio INTERSTROKE determinó que con únicamente diez factores se podría explicar el 90% del riesgo de padecer un ictus; hipertensión, tabaquismo, dieta, obesidad abdominal, actividad física regular, diabetes mellitus, consumo de

alcohol, factores psicosociales, causas cardíacas y el ratio de lipoproteínas ApoB/ApoA1 (O'Donnell et al., 2010). Sin embargo, aunque los intentos de actuar sobre los factores de riesgo modificables ha reducido la incidencia de ictus, la mortalidad y la discapacidad asociadas a esta patología siguen incrementando (Koton et al., 2012; Feigin and Norrving, 2014).

1.4. Clasificación

Basándonos en la naturaleza de la lesión, podemos agrupar los ictus en dos categorías principales: ictus isquémicos o ictus hemorrágicos.

El ictus isquémico es el más común y representa el 87% de todos los casos (Ovbiagele B et al., 2011; American Heart Association, 2015). La isquemia cerebral se define como la reducción del aporte sanguíneo hasta unos niveles insuficientes para mantener el metabolismo y funcionamiento normales de las células cerebrales (Brassai et al., 2015). La isquemia puede afectar solamente a una zona del encéfalo (isquemia focal), como ocurre en casos de oclusión arterial cerebral, o comprometer a todo el encéfalo de forma simultánea (isquemia global) como sucede en casos de parada cardíaca o hipotensión grave. La isquemia focal constituye la forma más frecuente de afectación vascular del cerebro (Arboix et al., 2008).

En la isquemia cerebral focal el daño está limitado al territorio irrigado por la arteria afectada y se produce como consecuencia de la oclusión de un vaso por trombosis o embolismo. Las arterias que se encuentran implicadas más frecuentemente en la isquemia cerebral son la arteria cerebral media (ACM) y sus ramificaciones (Slater, 2015). Se denomina ataque isquémico transitorio (AIT) a un episodio breve de disfunción neurológica de inicio brusco con síntomas clínicos de breve duración (minutos), que cursan con reperusión completa en menos de una hora y no presenta evidencias en las técnicas de neuroimagen. Los pacientes que han sufrido un AIT presentan un mayor riesgo a padecer un ictus que una persona que no lo ha padecido (Albers et al., 2002; Easton et al., 2004). Por otro lado, se

denomina infarto cerebral a la alteración del aporte sanguíneo a un territorio del encéfalo produciendo déficit neurológico durante más de 24 horas con evidencias de necrosis tisular según las técnicas de imagen (Donnan et al., 2008).

Los ictus hemorrágicos constituyen el 13% del total de casos de ictus (Ovbiagele B et al., 2011; American Heart Association, 2015). Estas patologías consisten en la extravasación de sangre dentro de la cavidad craneal debido a la rotura de un vaso sanguíneo arterial o venoso (Arboix et al., 2006). Se ha determinado la hipertensión arterial como su principal causa (Calandre et al., 1986).

Hasta el momento, en el caso del ictus isquémico el único tratamiento que ha demostrado una cierta eficacia es la recanalización por disolución del trombo con el activador tisular del plasminógeno recombinante (*r-TPA, recombinant-tissue plasminogen activator*) o mediante disrupción mecánica. En cambio, en casos de ictus hemorrágicos no hay ningún tratamiento que haya demostrado eficacia más allá de los cuidados generales, el manejo de la hemostasia y de la presión craneal.

1.5. Fisiopatología de la isquemia cerebral

Aunque el sistema nervioso central (SNC) solamente representa el 2% del peso total del organismo, presenta un requerimiento de oxígeno muy elevado, el 20% del total requerido por el organismo, y es totalmente dependiente de la disponibilidad de glucosa para la obtención de energía (Bolanos et al., 2010).

En el individuo adulto, el flujo sanguíneo cerebral (FSC) medio es de 50-60mL/100g de tejido/min. En el ictus isquémico, la oclusión arterial provoca una reducción no uniforme del FSC que permite diferenciar varias regiones en la lesión isquémica (Baron, 2001; Heiss et al., 2001; Castillo et al., 2003; Oku et al., 2010) (Figura 1):

- En el núcleo o *core* de la lesión, el FSC se reduce por debajo de 10mL/100g/min y en pocos minutos se produce un fallo irreversible del metabolismo energético.

- La zona de penumbra presenta un FSC comprendido entre 10-22mL/100g/min, apenas suficiente para conservar parcialmente el metabolismo de oxígeno, niveles basales de ATP y gradiente iónico. El tejido está funcionalmente comprometido pero tiene potencial de recuperación funcional. Sin embargo, sin una reperfusión suficiente, en función de la severidad y la duración de la isquemia, la penumbra puede evolucionar a *core*. Por este motivo es esencial la actuación terapéutica en las primeras horas desde la oclusión.
- La zona denominada de oligohemia se encuentra ligeramente hipoperfundida, >22mL/100g/min y sólo evoluciona a infarto en condiciones especialmente adversas.

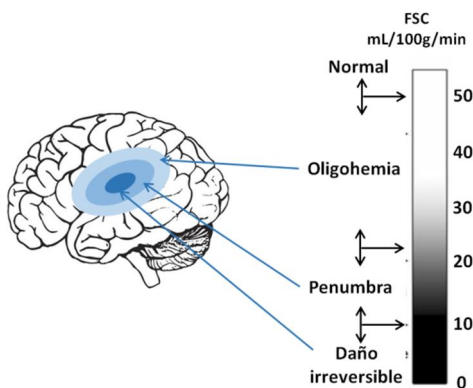


Figura 1. Lesión isquémica. FSC en las diferentes zonas de la lesión isquémica: core, penumbra, zona de oligohemia. Adaptada de Oku N. et al 2010 (Oku et al., 2010).

La isquemia cerebral inicia una cascada multifactorial, con eventos que tienen lugar a corto y largo plazo, denominada cascada isquémica (Pulsinelli, 1992; Lipton, 1999; Brouns and De Deyn, 2009). La secuencia de eventos se inicia con un fallo energético seguido de liberación de glutamato, elevación del calcio (Ca^{2+}) intracelular, estrés oxidativo, disfunción de la barrera hematoencefálica, inflamación y finalmente muerte neuronal (Figura 2).

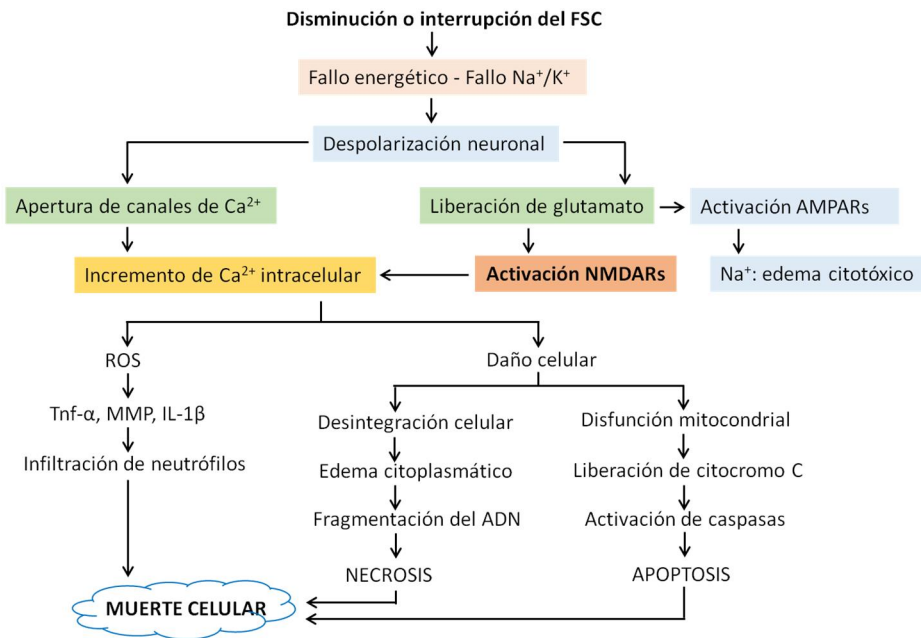


Figura 2. Secuencia de los principales eventos fisiopatológicos de la cascada isquémica.

Adaptada de Kaur H. 2013 (Kaur et al., 2013).

1.5.1. Fallo energético

La primera consecuencia de la isquemia cerebral es fundamentalmente un problema energético. En el área afectada por la disminución del FSC continúa el consumo de ATP aunque la síntesis es insuficiente, provocando la reducción de los niveles de ATP y fosfocreatina y la aparición de acidosis por la producción de lactato (Brouns and De Deyn, 2009; Xing et al., 2012). Este déficit de ATP induce la parada de la bomba sodio/potasio (Na^+/K^+) dependiente de ATP, provocando que la célula pierda la capacidad de recaptar K^+ y sufra despolarizaciones de la membrana neuronal (Martin et al., 1994; Katsura et al., 1994). Las despolarizaciones recurrentes originadas en el *core* se extienden al tejido circundante generando daño celular en la penumbra e incrementando así el volumen de tejido dañado. Finalmente, estas despolarizaciones resultan en la

denominada “despolarización anóxica” con entrada masiva de Ca^{2+} , Na^+ , cloro (Cl^-) y agua al citoplasma (Dirnagl et al., 1999; Moskowitz et al., 2010).

1.5.2. Excitotoxicidad

El fallo energético y los cambios iónicos asociados provocan el incremento del glutamato extracelular y la hiperexcitabilidad de los receptores de glutamato de tipo NMDA (*N-methyl-D-aspartate receptors*) y de tipo AMPA (*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol propionic acid receptors*) (Choi and Rothman, 1990; White et al., 2000). Debido a que el glutamato es un aminoácido excitador se denominó excitotoxicidad al daño neuronal asociado a la excesiva y prolongada activación de receptores por aminoácidos (aa) excitadores (Olney, 1969). La muerte excitotóxica en la isquemia cerebral está mediada mayoritariamente por la sobreactivación de receptores de glutamato de tipo NMDA y la entrada masiva de Ca^{2+} a través de los mismos (Rothman and Olney, 1986; Choi, 1988). Los receptores de glutamato de tipo AMPA y kainato contribuyen a la muerte excitotóxica mediante la entrada de iones Na^+ , Cl^- y Ca^{2+} y la salida de iones K^+ , aunque lo hacen en menor medida que los receptores de tipo NMDA (Dirnagl et al., 1999; Szydlowska and Tymianski, 2010).

1.5.3. Calcio intracelular

La sobreactivación de los NMDARs produce un importante incremento del Ca^{2+} intracelular, aunque no son los únicos responsables de esta acumulación. La reversión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX, *$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger*) que expulsa Na^+ a cambio de la entrada de Ca^{2+} (Hoyt and Reynolds, 1998; Kostandy, 2012), la disfunción mitocondrial y del retículo endoplasmático (RE) (White and Reynolds, 1996; Duchen, 2000; Nicholls et al., 2007; Szydlowska and Tymianski, 2010), así como la acidosis producida por la isquemia colaboran en el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular (Xiong et al., 2006). Varios estudios han demostrado que el principal determinante de la neurotoxicidad del Ca^{2+} es la ruta

por la cual el Ca^{2+} entra al espacio intracelular; así la entrada mediante canales de Ca^{2+} regulados por voltaje no producen muerte neuronal mientras que la entrada de Ca^{2+} a través de receptores de NMDA es tóxica para la célula (Hardingham et al., 1997; Sattler et al., 1998). El incremento en la concentración de Ca^{2+} activa enzimas proteolíticas y lipolíticas (entre las que se encuentran proteasas, lipasas, fosfatasa, endonucleasas y calpaínas) y enzimas como la óxido nítrico sintasa (NOs, *nitric oxide synthase*) que incrementa la síntesis de óxido nítrico (NO, *nitric oxide*). Esta sobreactivación conduce al daño en la estructura celular y a la formación de radicales libres y especies reactivas que exacerbaran el daño (Zhang et al., 1995, Kelly et al., 2008; Szydłowska et al., 2010).

1.5.4. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo está causado por un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad del sistema para detoxificar y/o reparar el daño resultante. Durante la isquemia cerebral, y especialmente durante la reperfusión, se generan radicales libres que son especies moleculares con un electrón desemparejado en su orbital externo que les confiere una alta reactividad. Los radicales libres mayormente implicados en estos procesos son las especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) como el anión superóxido, el radical hidroxilo y el NO (Woodruff et al., 2011). Tras un estímulo excitotóxico se activa el metabolismo de los fosfolípidos de membrana que comporta una acumulación de ácidos grasos. El catabolismo de estos ácidos grasos, en particular el del ácido araquidónico, genera ROS. Durante fases intermedias, se producen ROS por la infiltración de neutrófilos en el área isquémica y en las fases tardías son producidas mediante la síntesis y activación de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, *inducible nitric oxide synthase*) y ciclooxigenasa-2 (COX-2, *cyclooxygenase-2*) (Grandati et al., 1997; Nogawa et al., 1997; Woodruff et al., 2011). Los radicales libres y las ROS dañan directamente lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos y son especialmente tóxicos porque las defensas antioxidantes de

la célula se ven superadas debido a la falta de energía producida por la isquemia (Chan, 2001; Lo et al., 2003; Xing et al., 2012). La peroxidación de las membranas lipídicas por las ROS genera aldehídos tóxicos como el *4-hydroxynonenal* (4-HNE), que afecta a una gran variedad de canales iónicos, transportadores y proteínas del citoesqueleto (Mehta et al., 2007). El estrés oxidativo contribuye a la disrupción de la Barrera Hematoencefálica mediante la activación de metaloproteinasas de matriz (MMPs, *matrix metalloproteinase*), especialmente la MMP-9 (Montaner et al., 2003) y el daño de células endoteliales (Siesjo et al., 1989; Chan, 2001).

1.5.5. Inflamación

En el tejido afectado por la isquemia se produce una respuesta inflamatoria que puede mantenerse durante días o semanas. La muerte necrótica asociada a la isquemia cerebral desencadena una respuesta inmunitaria que cursa con la activación e infiltración de células inflamatorias. Las principales células residentes implicadas en la inflamación son la microglia y los astrocitos. Cuando se produce un daño celular los astrocitos y la microglia se activan adquiriendo una morfología ameboide que les permite migrar y proliferar en el área afectada (Stoll et al., 1998). La liberación de moléculas inflamatorias como citoquinas y quimioquinas contribuyen directamente al daño generado por la isquemia cerebral al inducir la expresión de iNOS, COX-2 o MMPs (Iadecola and Gorelick, 2005). También las moléculas secretadas por células cerebrales que están muriendo contribuyen a la respuesta inflamatoria.

Entre 4 y 6 horas tras el inicio de la isquemia, los leucocitos circulantes se van adheriendo y acumulando en la pared de los vasos sanguíneos y se liberan moléculas proinflamatorias en el tejido isquémico. Los neutrófilos son el primer subtipo de leucocitos en la infiltración de las áreas isquémicas (Tang et al., 2006; Buck et al., 2008), mientras que la infiltración de linfocitos incrementa a las 24 horas tras el ataque isquémico y alcanza su máximo alrededor del tercer día, por lo que se cree que participan en la fase tardía de la isquemia cerebral (Woodruff

et al., 2011). También se produce una migración de monocitos desde el flujo sanguíneo, un tercio de los cuales se diferencian a microglia alrededor del día 14 tras el episodio de ictus (Priller et al., 2001).

Existe un gran debate respecto al papel que juega la respuesta inflamatoria en la isquemia y postisquemia. Actualmente se ha aceptado que en la fase aguda la inflamación incrementa el daño y exacerba el déficit neurológico, mientras que en etapas posteriores la inflamación participa en la reparación tisular (Moskowitz et al., 2010).

1.5.6. Expresión génica

La isquemia cerebral dispara una gran variedad de cambios en la función, metabolismo y morfología cerebral que están asociados a la inducción o represión de genes específicos. Los cambios en la expresión génica inmediata y constitutiva tras la isquemia cerebral están mediados por la regulación de la transcripción mediante factores de transcripción como el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF, *hypoxia-inducible factor*), que controla la transcripción de un gran número de genes tras la isquemia (Buttner et al., 2009). Se ha determinado un incremento en la expresión de genes involucrados en reacciones inflamatorias y de respuesta inmune ya a las 6h de reperusión, aunque la inducción más potente de estos genes tiene lugar después de 24h de reperusión. Otros genes que muestran un incremento de la expresión están relacionados con señalización celular, remodelación o apoptosis (Buttner et al., 2009).

1.5.7. Muerte neuronal: necrosis / apoptosis / autofagia

El resultado final de los procesos que conforman la cascada isquémica es la muerte neuronal, en la que se mezclan características de mecanismos de necrosis, apoptosis y autofagia (Qin et al., 2008; Rami, 2009). El tipo de muerte neuronal inducida depende de la intensidad del ataque isquémico.

En el *core* de la lesión isquémica la acidosis producida por la disminución severa de los niveles de ATP y la pérdida de homeostasis iónica provoca en pocos minutos muerte celular necrótica, caracterizada por cambios morfológicos, especialmente en la membrana plasmática que pierde su capacidad de regulación, y finalmente lisis celular que contribuye al proceso inflamatorio (Edinger and Thompson, 2004; Moskowitz et al., 2010; Arai et al., 2011). Por otro lado, en la zona de penumbra en la que el ataque isquémico es menos intenso se produce muerte apoptótica o muerte celular programada (Ankarcrona et al., 1995; Cheung et al., 1998). En la muerte apoptótica se produce condensación de la cromatina, aparición de protuberancias (*bebbling*) en la membrana celular y finalmente fragmentación de DNA y formación de cuerpos apoptóticos que son eliminados por fagocitosis sin generar respuesta inflamatoria (Edinger and Thompson, 2004; Moskowitz et al., 2010; Arai et al., 2011).

La autofagia es el proceso mediante el cual una membrana envuelve orgánulos y macromoléculas citosólicas formando un autofagosoma, que se fusionará con un lisosoma generando un autolisosoma en el cual se producirá la degradación de su contenido mediante las enzimas lisosomales (Puyal et al., 2012). La correlación entre apoptosis, necrosis y autofagia y sus procesos patológicos en el ictus isquémico no está clara. En 2012 se observó que tanto la apoptosis como la autofagia están activadas en la penumbra isquémica (Balduini et al., 2012). Actualmente no existe un consenso sobre el papel de la autofagia en el ictus isquémico (Chen et al., 2014b), unos estudios indican que promueve supervivencia neuronal (Carlioni et al., 2008; Carlioni 2010; Wang 2012) mientras que otros sugieren un papel dañino (Koike 2008; Ginet V 2014). Según los estudios más recientes, niveles fisiológicos de autofagia serían favorables para la supervivencia neuronal mientras que niveles excesivos o inadecuados pueden ser perjudiciales (Kang and Avery, 2008; Shi et al., 2012; Li et al., 2013). También parece ser determinante para el destino de las neuronas el momento de la isquemia cerebral en que se produce inducción de autofagia, ejerciendo un papel protector en el preconditionamiento isquémico pero un efecto dañino una vez

que se ha producido la isquemia/reperfusión (Ravikumar et al., 2010; Sheng et al., 2010; Yan et al., 2011; He 2012).

1.6. Tratamiento del ictus isquémico agudo

La intervención terapéutica del ictus isquémico en fase aguda es crucial para el pronóstico funcional del enfermo. El concepto “*tiempo es cerebro*” ilustra que el tratamiento del ictus debe ser considerado una emergencia médica (Hill and Hachinski, 1998), debido a que el tiempo en el que las neuronas de la zona afectada son salvables, denominado ventana terapéutica, es reducido (Figura 3).

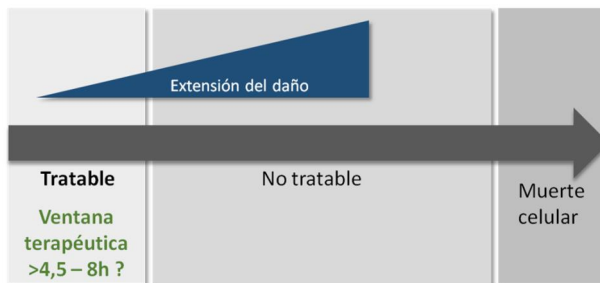


Figura 3. Esquema mostrando la limitada ventana terapéutica existente para la administración del tratamiento. La aplicación del tratamiento está restringida a un corto plazo de tiempo, denominado ventana terapéutica, tras el cual la extensión del daño es demasiado elevada y las neuronas ya no son salvables.

El código ictus comprende un procedimiento de actuación mediante protocolos establecidos, reconocimiento de la urgencia y transporte a centros especializados con preaviso de los mismos, con demostrada eficacia reduciendo el tiempo de demora en la aplicación de tratamiento (Perez de la Ossa-Herrero, 2008; Chen et al., 2014a). El recurso más eficiente en el tratamiento del ictus es el ingreso del paciente en unidades de ictus. Se trata de unidades de cuidados agudos no intensivos formadas por un equipo multidisciplinar, con control constante y detección precoz de posibles complicaciones. Las unidades de ictus han demostrado una reducción significativa en la mortalidad y dependencia de los pacientes de ictus (Diez-Tejedor and Fuentes, 2001; Donnan et al., 2008; Fuentes and Diez-Tejedor, 2009).

Las estrategias terapéuticas actuales están basadas en la lisis del trombo (trombolisis) o la extracción mecánica del trombo (trombectomía) y se están investigando terapias que promuevan neuroprotección y neuroreparación.

1.6.1. Trombolisis / Trombectomía

En la práctica clínica, la reperfusión o recanalización constituye el principal objetivo en el tratamiento del ictus isquémico. La reperfusión persigue el restablecimiento de la perfusión cerebral a tiempo de salvar el tejido cerebral que no ha experimentado un daño irreversible (zona de penumbra). En este sentido, las estrategias que aportan más beneficios al paciente en términos de déficit neurológico a los tres meses, son la trombolisis farmacológica o la trombectomía mecánica.

El único tratamiento aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para el ictus isquémico es el r-TPA, que ha resultado ser muy efectivo en la reducción de la discapacidad post-ictus. Sin embargo solamente el 3-7% de los pacientes se benefician de esta estrategia debido a su reducida ventana terapéutica (4,5 h) y el elevado riesgo de transformación hemorrágica (Donnan et al., 2008; Mattle et al., 2008; Rha and Saver, 2007). La selección de pacientes con un área de penumbra extensa puede permitir la extensión de esta ventana terapéutica (Rodríguez-Yanez et al., 2011).

Por otro lado, la trombectomía mecánica constituye una alternativa viable en casos en que la terapia trombolítica no ha funcionado o en pacientes con contraindicaciones a la trombolisis sistémica. También la terapia trombolítica intravenosa o intraarterial combinada con trombectomía mecánica ha obtenido muy buenos resultados (Struffert et al., 2009; Pfefferkorn et al., 2008). Recientemente, los datos mostrados por estudios como ESCAPE (*Endovascular Treatment for Small Core and Anterior Circulation Proximal Occlusion with Emphasis on Minimizing CT to Recanalization Times*) (Goyal et al., 2015), EXTEND-IA (*Extending the Time for Thrombolysis in Emergency Neurological Deficits-Intra-*

Arterial trial) (Campbell et al., 2015), REVASCAT (*Randomized Trial of Revascularization with Solitaire FR Device versus Best Medical Therapy in the Treatment of Acute Stroke Due to Anterior Circulation Large Vessel Occlusion Presenting within Eight Hours of Symptom Onset*) (Jovin et al., 2015) y SWIFT PRIME (*Solitaire with the Intention for Thrombectomy as Primary Endovascular Treatment trial*) (Saver et al., 2015) han marcado un importante cambio en la percepción del gran beneficio de la trombectomía mecánica tras la administración de rTPA para el tratamiento de oclusiones anteriores proximales de larga duración (> 4,5 h) en pacientes seleccionados mediante criterios de neuroimagen.

1.6.2. Neuroprotección

Otra estrategia contemplada en el tratamiento del ictus isquémico es la neuroprotección. Esta estrategia no afecta a la reperusión del tejido sino que consiste en la intervención sobre las vías bioquímicas que conducen al daño celular y muerte en la isquemia cerebral con el objetivo de rescatar el tejido salvable. La neuroprotección no tiene sentido en regiones cerebrales con daño irreversible pero puede contribuir en la preservación de aquellas zonas en fallo energético pero con neuronas aún viables (penumbra isquémica) (Ginsberg, 1997; Wahlgren and Ahmed, 2004; Ginsberg, 2009). Además, la combinación de terapia trombolítica con agentes neuroprotectores podría ser beneficiosa para proteger el tejido cerebral del daño por reperusión o ampliar la ventana terapéutica (O'Collins et al., 2012; Wang et al., 2015).

En los últimos años se han testado un elevado número de compuestos dirigidos al bloqueo de las reacciones moleculares que conducen a la muerte neuronal en diferentes puntos de la cascada isquémica, entre ellos bloqueadores de Ca^{2+} , antagonistas de glutamato, antioxidantes, inhibidores de la liberación de glutamato o de la peroxidación lipídica y antiinflamatorios (Ducruet et al., 2009; Woodruff et al., 2011; Kaur et al., 2013; Grupke et al., 2015). La mayoría de los compuestos han obtenido efectos positivos en estudios experimentales, aunque

ninguno de ellos ha mostrado efectos beneficiosos en estudios clínicos (Castillo et al., 2003; Ginsberg, 2009; Kaur et al., 2013; Grupke et al., 2015).

1.6.3. Neuroreparación

En la última década, varios grupos han demostrado que la neurogénesis, el proceso de generación de nuevas neuronas funcionales a partir de células neurales progenitoras, persiste en el individuo adulto. Además, se ha determinado un incremento de neurogénesis en modelos animales y en pacientes de ictus isquémico (Jin et al., 2001; Thored et al., 2006; Jin et al., 2006). Este proceso de neurogénesis no es independiente sino que está acoplado a la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante la ramificación de vasos preexistentes, denominada angiogénesis. Se ha observado que la angiogénesis se produce en la penumbra isquémica de modelos animales e, incluso, en el cerebro de pacientes (Krupinski et al., 1994; Hayashi et al., 2003b). Ambos procesos están coordinados y acoplados para incrementar la reparación cerebral tras el daño isquémico (Ruan et al., 2015). En estudios experimentales se han utilizado estrategias farmacológicas y celulares que promueven la recuperación funcional de los animales tras la isquemia (Font et al., 2010). Estos resultados sugieren que las terapias dirigidas a potenciar las señales endógenas neuroprotectoras constituyen una nueva estrategia para el tratamiento del ictus.

2. RECEPTORES DE GLUTAMATO; NMDARs

Los receptores de glutamato (GluRs) son moléculas receptoras del aminoácido excitador glutamato y son responsables en gran medida de la neurotransmisión excitatoria en el sistema nervioso central de los mamíferos. Según el mecanismo de transmisión de la señal de activación se clasifican en receptores de glutamato metabotrópicos (mGluRs) o receptores de glutamato ionotrópicos (iGluRs). Los mGluRs están formados por siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G que transducen la señal mediante una cascada de señalización en la que

intervienen segundos mensajeros intracelulares (Gudermann et al., 1995). Estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos por el sistema nervioso central regulando la excitabilidad celular y la transmisión sináptica neuronal (Ferraguti and Shigemoto, 2006). Los iGluRs están formados por varias subunidades proteicas que forman canales iónicos específicos de catión, cuya apertura se regula por la unión de ligandos específicos (Nakanishi et al., 1992; Hollmann et al., 1994). Los iGluRs se clasifican en tres grupos en función de su capacidad para reaccionar frente a distintos agonistas; los AMPARs, receptores de kainato y NMDARs (Michaelis et al., 1998). La presente tesis doctoral se ha centrado en el estudio de los NMDARs debido a que son los principales responsables de la muerte excitotóxica en el ictus (Dirnagl et al., 1999; Chen et al., 2008; Szydłowska and Tymianski, 2010).

Los NMDARs constituyen el subtipo de canales iónicos regulados por glutamato más abundantes en las sinapsis excitadoras del SNC, mediando la entrada de Na^+ y Ca^{2+} y la salida de K^+ de la célula (Sanz-Clemente et al., 2013). Participan en funciones importantes como la transmisión sináptica excitatoria, plasticidad, aprendizaje o memoria. Sin embargo, su sobreestimulación induce muerte celular excitotóxica y contribuye a la degeneración neuronal en varios desórdenes como isquemia, epilepsia y en patologías neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson (Ozawa et al., 1998; Hardingham and Bading, 2010) y su hipofunción está implicada en patologías como la esquizofrenia (Choi, 1988; Lipton and Rosenberg, 1994; Moghaddam and Jackson, 2003; Mishizen-Eberz et al., 2004).

2.1. Estructura de los receptores de NMDA

Los NMDARs forman estructuras tetraméricas (Flores-Soto et al., 2012) y a lo largo de los años 90 se descubrió que están formados por combinaciones de varias subunidades (Moriyoshi et al., 1991; Sugihara et al., 1992; Das et al., 1998). Las subunidades están codificadas por 7 genes diferentes y se clasifican, en función de su origen genético y función, en la subunidad NR1, cuatro subunidades

NR2 (NR2A, NR2B, NR2C y NR2D) y dos subunidades NR3 (NR3A y NR3B). La secuencia de aa de las distintas subunidades tienen una homología del 20% entre las formas NR1, NR2 y NR3 (Kutsuwada et al., 1992; Chatterton et al., 2002) y de un 50% entre NR2 y NR3 (Ishii et al., 1993; Chatterton et al., 2002). Toda esta estructura forma un canal iónico permeable a Ca^{2+} .

Los NMDARs funcionales generalmente están formados por tetrámeros heteroméricos compuestos por dos dímeros formados por dos subunidades NR1 en combinación con dos subunidades NR2. Cada subunidad NR1 tiene un sitio de unión a glicina o D-serina y cada una de las subunidades NR2 tiene un sitio de unión a glutamato, así cada receptor funcional presenta dos sitios de unión para glicina o D-serina y dos para glutamato (Schorge and Colquhoun, 2003; Papadakis et al., 2004; Schuler et al., 2008; Flores-Soto et al., 2012).

En estado de reposo, los NMDARs están bloqueados por la presencia de iones de magnesio (Mg^{2+}) extracelular en el poro del canal. La activación y apertura del canal requiere por un lado una despolarización de membrana para liberar el bloqueo por Mg^{2+} y por otro, la unión de dos ligandos; glutamato y de D-serina o glicina (Flores-Soto et al., 2012; Sanz-Clemente et al., 2013). El sitio de unión de la glicina es diferente al del glutamato y ambos tienen que estar ocupados para que se produzca la apertura del canal (Figura 4) (Moriyoshi et al., 1991; Flores-Soto et al., 2012; Papouin et al., 2012; Sanz-Clemente et al., 2013).

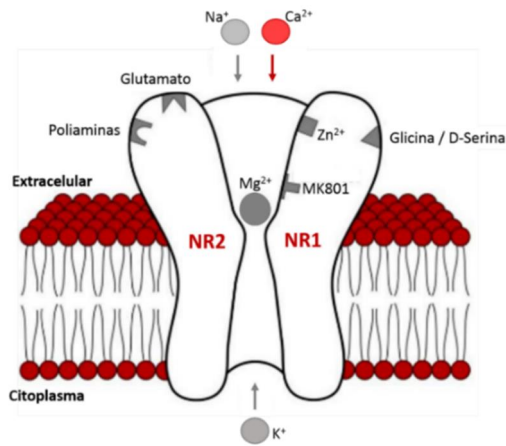


Figura 4. Representación de la estructura de organización básica de los NMDARs. La activación de los NMDARs requiere la unión de glutamato (vía NR2), glicina (vía NR1) y la liberación del bloqueo por magnesio mediante despolarización de membrana. *Adaptada de Tomek SE 2013 (Tomek et al., 2013).*

Cada subunidad de los NMDARs presenta una estructura muy similar consistente en un dominio N-terminal extracelular con un dominio de unión a ligando, seguido de tres segmentos transmembrana (TM1, TM3 y TM4), un dominio en forma de horquilla que atraviesa parcialmente la membrana (TM2) para formar el canal iónico y, finalmente, un dominio C-terminal en la región intracelular (Ozawa et al., 1998; Flores-Soto et al., 2012; Chandrasekar, 2013) (Figura 5).

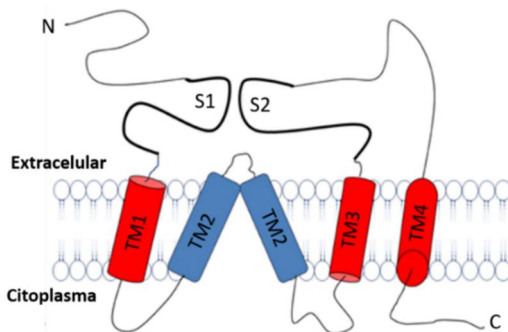


Figura 5. Representación de la estructura de las subunidades de los NMDARs. Cada subunidad está formada por un dominio extracelular N-terminal que contiene un dominio de unión a ligando (S1 y S2) donde se unen el glutamato y la glicina/D-serina. Seguidamente contiene tres dominios transmembrana (TM1, 3 y 4), un loop (TM2) y finalmente un dominio C-terminal intracelular. *Adaptada de Chandrasekar R. 2013 (Chandrasekar, 2013).*

Los NMDARs constituidos por NR1/NR2A o NR1/2NR2B son los más frecuentes en el sistema nervioso central de los mamíferos (Lujan et al., 2012)] (Figura 4). Se ha determinado que los NMDARs formados únicamente por subunidades NR1 dan lugar a canales que se activan por glutamato en presencia de glicina, pero producen corrientes de muy baja amplitud comparados con los formados por la combinación NR1/NR2 (Yamazaki et al., 1992). Los NMDARs formados únicamente por subunidades NR2 no generan receptores funcionales y son considerados moduladores (Yamazaki et al., 1992; Lynch and Guttman, 2001). Los receptores NR1/NR2C presentan baja probabilidad de apertura y los NR1/NR2D muestran una incrementada afinidad por glutamato y una menor sensibilidad al bloqueo por Mg^{2+} (Cathala et al., 2000; Lu et al., 2006). La combinación NR1/NR3 forma receptores insensibles a glutamato y al bloqueo por Mg^{2+} (Das et al., 1998; Chatterton et al., 2002).

En córtex e hipocampo de individuos adultos se han identificado triheterómeros formados por NR1/NR2A/NR2B pero todavía no se conoce su contribución a la población total de NMDARs. Se estima que en hipocampo representan una tercera parte de los NMDARs (Al-Hallaq et al., 2007). Estos receptores formados por las tres subunidades presentan características intermedias entre receptores NR1/NR2A o NR1/NR2B (Hatton and Paoletti, 2005). Se ha demostrado que la subunidad NR2B juega un papel dominante en el tráfico de los NMDARs debido a que los triheterómeros presentan un ratio de internalización y reciclaje similar a la de los receptores formados por NR1/NR2B (Tang et al., 2010). Sin embargo, actualmente no existen herramientas bioquímicas o farmacológicas para analizarlos específicamente (Sanz-Clemente et al., 2013).

2.1.1. Subunidad NR1

La expresión de la subunidad NR1 en el cerebro de los embriones de rata se inicia a los 14 días de gestación y sus niveles incrementan gradualmente hasta las tres semanas tras el nacimiento (Luo et al., 1996, Laurie et al., 1997). La delección

genética de esta subunidad elimina completamente la actividad NMDAR y los animales mueren poco después del nacimiento, indicando que NR1 es una subunidad esencial en todos los tipos de NMDARs funcionales (Forrest et al., 1994; Sanz-Clemente et al., 2013).

Existen 8 variantes de esta subunidad que difieren en la presencia o ausencia de una secuencia de 21 aa en la región N-terminal y un procesamiento diferencial de la secuencia de la región C-terminal (Zukin and Bennett, 1995; Holmes et al., 2002). La región N-terminal es importante para la regulación de las propiedades del canal mientras que la región C-terminal, que contiene sitios de interacción con neurofilamentos, secuencias de retención en el RE, sitios de fosforilación por proteínas quinasa y una región de unión a proteínas PDZ, juega un papel importante en la regulación y localización de los NMDARs en la membrana celular (Dingledine et al., 1999; Flores-Soto et al., 2012).

2.1.2. Subunidad NR2

En comparación con NR1, los patrones de expresión de las subunidades NR2 son diferentes en términos de tiempo/espacio y es esta subunidad NR2 la que determina la diversidad funcional de los NMDARs (Vicini et al., 1998; Babb et al., 2005). Existen cuatro isoformas de las subunidades NR2 codificadas por varios genes; NR2A, NR2B, NR2C y NR2D.

Durante el desarrollo prenatal de ratas y ratones, en el córtex cerebral solamente se han podido detectar mRNAs para NR2B y NR1 (Watanabe et al., 1992; Monyer et al., 1994). La elevada expresión de la subunidad NR2B en el momento del nacimiento se mantiene durante el desarrollo postnatal y disminuye durante la edad adulta. Por otro lado, la expresión de la subunidad NR2A aparece alrededor del día 7 postnatal e incrementa durante las siguientes 2-3 semanas hasta alcanzar los niveles presentes en el adulto (Monyer et al., 1994). En los primeros estadios del desarrollo, los primeros receptores de NMDA que se expresan en las sinapsis son los formados por NR1/NR2B. Durante la formación de las sinapsis maduras, se produce un cambio progresivo de NMDARs sinápticos formados por

NR1/NR2B a los formados por NR1/NR2A, quedando así la mayoría de las subunidades NR2B formando parte de los NMDARs extrasinápticos (Monyer et al., 1994; Tovar and Westbrook, 1999; Liu et al., 2007; Rauner and Kohr, 2011).

Las subunidades NR2A y NR2B han sido muy estudiadas en las últimas décadas. Ambas presentan una elevada expresión en córtex e hipocampo y juegan un papel central en la función y plasticidad sináptica. Están involucradas en aprendizaje y memoria y, a su vez, implicadas en varias enfermedades neurológicas como Alzheimer y Huntington (Ronicke et al., 2010; Gladding et al., 2011; Sanz-Clemente et al., 2013). Los NMDARs con subunidades NR2B presentan una mayor permeabilidad y flujo de Ca^{2+} y son activados con una concentración menor de glutamato que los formados por NR2A (Flores-Soto et al., 2012; Sanz-Clemente et al., 2013). En 2012 se determinó que estas subunidades son activadas por coagonistas distintos, los NMDARs formados por NR1/NR2A (NMDARs-NR2A) responden al coagonista D-serina mientras que los NMDARs formados por NR1/NR2B (NMDARs-NR2B) responden a glicina (Papouin et al., 2012). Aunque los ratones knock-out para NR2A son viables, estos animales muestran una disminución de la plasticidad sináptica y una reducida formación de la memoria espacial (Sakimura et al., 1995). En cambio, knock-outs de NR2B son menos viables, presentando deficiencias graves en el desarrollo neuronal (Brigman et al., 2010).

La subunidad NR2C se detecta a día 10-11 postnatal e incrementa progresivamente durante el desarrollo, presentando una elevada expresión en el cerebelo del adulto (Laurie et al., 1997). Se caracteriza por una baja conductividad y selectividad a Mg^{2+} , característica que permite su activación sin necesidad de despolarización postsináptica (Laurie et al., 1997; Binshtok et al., 2006). En cambio, la subunidad NR2D se expresa tempranamente en el desarrollo y va disminuyendo hasta la edad adulta, momento en que está más presente en el diencéfalo, mesencéfalo y en la médula espinal (Monyer et al., 1994; Laurie et al.,

1997). Aunque en algunas neuronas se ha identificado en zonas extrasinápticas, su presencia en la sinapsis es aún muy discutida (Sanz-Clemente et al., 2013).

El dominio N-terminal de las subunidades NR2 contiene sitios de unión para ligandos exógenos que pueden ejercer un efecto regulador de la actividad del NMDAR permitiendo incrementos o disminuciones en el flujo de calcio a través del receptor bajo condiciones fisiológicas o patológicas o bien modulando la localización de estos receptores (Dalva et al., 2000; Groc et al., 2007; Flores-Soto et al., 2012). Por otro lado, el dominio C-terminal de estas subunidades, que es considerablemente más extenso que el de las subunidades NR1, ha demostrado ser fundamental para la función y localización de los NMDARs en modelos animales (Sprengel et al., 1998). Del mismo modo que NR1, el extremo C-terminal de las subunidades NR2 contiene secuencias de retención en RE, dominios de internalización, dominio de interacción con proteínas PDZ y también está sujeta a regulación por fosforilación (Hawkins et al., 2004; Chung et al., 2004; Traynelis et al., 2010; Flores-Soto et al., 2012). Se ha determinado que la modulación de las interacciones proteína-proteína que tienen lugar en este extremo C-terminal alteran la localización celular y la función de los NMDARs (Traynelis et al., 2010).

2.1.3. Subunidad NR3

Respecto a la subunidad NR3, existen 2 variantes (NR3A y NR3B) que son codificadas por diferentes genes. Durante las primeras fases del desarrollo postnatal, los niveles de NR3A son altos en varias regiones cerebrales mientras que mRNAs o niveles proteicos de NR3B son prácticamente indetectables (Matsuda et al., 2002; Wong et al., 2002). Desde la semana 7 postnatal (P7) hasta la semana 21 (P21) se produce una disminución en los niveles proteicos de NR3A (Wong et al., 2002) acompañado de un incremento de NR3B (Matsuda et al., 2002; Henson et al., 2010). La variante NR3A se expresa en prácticamente todo el sistema nervioso central mientras que la expresión de NR3B está algo más restringida a ciertas zonas cerebrales (Das et al., 1998; Matsuda et al., 2002;

Wong et al., 2002). A nivel neuronal, NR3A se encuentra en los dominios perisinápticos de la membrana postsináptica mientras que de la subunidad NR3B, se desconoce si se localiza preferentemente en algún compartimento específico (Perez-Otano et al., 2006; Low and Wee, 2010).

Las subunidades NR3 presentan una homología del 17-27% con las otras subunidades de los NMDARs (Andersson et al., 2001). Como la subunidad NR2, la NR3 es una subunidad reguladora y su presencia provoca la disminución de las corrientes iónicas generadas por la activación de heterómeros NR1/NR2. Requiere también el ensamblaje con la subunidad NR1 para expresarse en la superficie celular (Matsuda et al., 2002; Matsuda et al., 2003; Perez-Otano et al., 2006), de manera que la combinación NR1-NR3 forma receptores excitados por glicina pero insensibles para glutamato y que solamente responden medianamente al bloqueo por Mg^{2+} (Chatterton et al., 2002; Smothers and Woodward, 2007). Los triheterómeros formados por subunidades NR1/NR2/NR3 son sensibles a glutamato pero presentan baja probabilidad de apertura, baja permeabilidad a Ca^{2+} y poca sensibilidad a Mg^{2+} (Henson et al., 2010). De manera que la temprana expresión de la subunidad NR3A y las características únicas de este canal sugieren que pueda actuar atenuando la función de los receptores de NMDA durante el desarrollo y maduración sináptica (Das et al., 1998; Wong et al., 2002; Chatterton et al., 2002; Sanz-Clemente et al., 2013).

2.2. NMDARs sinápticos y extrasinápticos

2.2.1. Localización

Los NMDARs se encuentran distribuidos tanto en zonas sinápticas como en zonas extrasinápticas. Los NMDARs sinápticos se localizan en la membrana plasmática que se halla en contacto con la densidad postsináptica (PSD, postsynaptic density) mientras que los NMDARs extrasinápticos están localizados en las espinas neuronales, dendritas o soma, alejados de la PSD (Zhou et al., 2015b). La PSD es

una estructura densa localizada bajo las membranas postsinápticas de sinapsis glutamatérgicas, formada por complejos multiproteína que contienen receptores, proteínas de señalización y moléculas de soporte e involucrada en transmisión sináptica y plasticidad (Bartolomeis A 2014; Kim E 2006; Kennedy MB 1997). La activación constitutiva de NMDARs se mantiene en cerebros sanos por unos niveles de glutamato extracelular entre 0.5-5 μM . Los NMDARs sinápticos son activados por el glutamato liberado en el terminal presináptico mientras que la mayoría de los NMDARs extrasinápticos son activados por el excedente de glutamato (>20 μM) que proviene de una actividad sináptica intensa o una liberación masiva de glutamato que rebosa de la hendidura sináptica (Harris and Pettit, 2008; Featherstone and Shippey, 2008) (Figura 6).

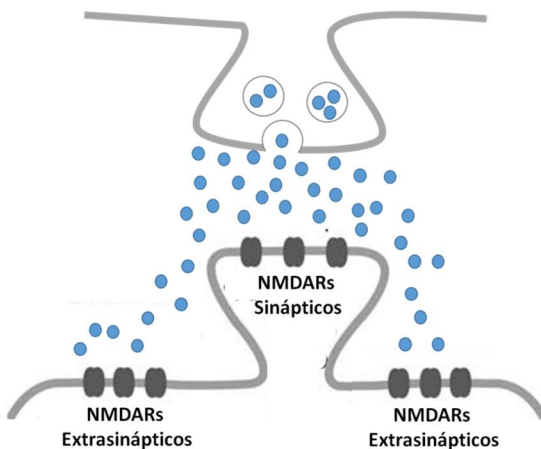


Figura 6. Representación de la localización de NMDARs en zonas sinápticas o extrasinápticas. Los NMDARs sinápticos son activados por el glutamato liberado en el terminal pre-sináptico. En cambio, la mayoría de los NMDARs extrasinápticos son activados por el excedente de glutamato que proviene de una liberación masiva de glutamato que rebosa de la hendidura sináptica.

Existe un intenso debate sobre la localización de los NMDARs formados por las subunidades NR2A o NR2B. Ciertas evidencias indican que neuronas inmaduras en cultivo presentan una larga fracción de NMDARs-NR2B tanto en sinapsis como en zonas extrasinápticas. Se ha determinado que durante el desarrollo se produce un cambio progresivo de los primeros NMDARs sinápticos formados por NR1/NR2B a NMDARs formados por NR1/NR2A, quedando los NR2B en las zonas extrasinápticas (Barth and Malenka, 2001; Liu et al., 2004). Actualmente se ha alcanzado un acuerdo general respecto a que en neuronas maduras la mayoría de

los NMDARs sinápticos son NR1/NR2A y que la población de NMDARs extrasináptica contiene mayoritariamente NR1/NR2B (Stocca and Vicini, 1998; Tovar and Westbrook, 1999; Hardingham et al., 2002; Vizi et al., 2013). En este sentido, se ha demostrado que NMDARs con la subunidad NR2A median un 68% de la corriente sináptica y un 27% de la extrasináptica. Así, los NMDARs-NR2B mediarían el 73% de la corriente extrasináptica, lo cual confirma que la mayoría de los NMDARs sinápticos están formados por la subunidad NR2A y los extrasinápticos por NR2B (Liu et al., 2007).

2.2.2. Señalización

Durante años se mantuvo la idea de que era la cantidad de Ca^{2+} que entraba a través de los NMDARs lo que determinaba la viabilidad o muerte de las neuronas (Lipton and Nakanishi, 1999). Aunque los primeros trabajos que intentaron diferenciar las distintas capacidades de los NMDARs sinápticos y extrasinápticos para inducir excitotoxicidad no llegaron a una conclusión, estudios posteriores demostraron que los NMDARs sinápticos y extrasinápticos poseen funciones diferentes y, en ocasiones, opuestas (Hardingham et al., 2002; Ivanov et al., 2006). Según el modelo presentado por Hardingham y Bading (Hardingham and Bading 2010), la entrada de Ca^{2+} a través de receptores localizados en la sinapsis dispara procesos que incrementan la resistencia de las neuronas a la apoptosis y el estrés oxidativo mientras que la entrada de Ca^{2+} a través de los NMDARs extrasinápticos provoca disfunción mitocondrial y muerte celular (Hardingham et al., 2002). Además, otros estudios han mostrado que ciertos efectos de señalización de los receptores extrasinápticos dominan sobre la señalización sináptica (Hardingham et al., 2002; Ivanov et al., 2006; Zhang et al., 2007b; Papadia et al., 2008).

El trabajo de Liu Y et al. sugirió que es la composición de subunidades de estos receptores lo que determina la muerte neuronal y no su localización en zonas sinápticas o extrasinápticas. Estos investigadores determinaron que la activación de NMDARs-NR2A sinápticos y extrasinápticos promueve la supervivencia

neuronal mientras que la activación de NMDARs-NR2B sinápticos o extrasinápticos conduce a excitotoxicidad. En condiciones fisiológicas la señalización a supervivencia promovida por NMDARs-NR2A contrarresta la acción apoptótica de NMDAR-NR2B sinápticos mientras que en condiciones patológicas la señalización de muerte neuronal activada por NMDARs-NR2B extrasinápticos supera a las señales de supervivencia de los NMDARs-NR2A extrasinápticos. Esto se explicaría por la localización preferencial de las subunidades en sinapsis (NR2A) o zonas extrasinápticas (NR2B), así una activación selectiva de NMDARs sinápticos o extrasinápticos resultaría en la activación de vías de supervivencia por parte de NMDARs-NR2A o vías de muerte por NMDARs-NR2B (Liu et al., 2007).

Por otro lado, en 2009 se determinó que la activación selectiva de receptores extrasinápticos provocaba la misma cantidad de muerte neuronal que la activación conjunta de receptores sinápticos y extrasinápticos (Stanika et al., 2009). En 2013, el estudio de Zhou X. y cols. demostró que la coactivación de NMDARs sinápticos y extrasinápticos en cultivos primarios de neuronas corticales conducía a muerte neuronal y que el grado de excitotoxicidad dependía de la magnitud y duración de esta coactivación. En este sentido, observaron que una coactivación breve conducía a un incremento de la supervivencia más que a señalización apoptótica (Zhou et al., 2013). En 2014 otro estudio realizado en cortes de tejido cerebral atribuyó la citotoxicidad mediada por NMDARs a la coactivación de receptores sinápticos y extrasinápticos, pero no a la exclusiva activación de NMDARs extrasinápticos (Chen et al., 2014c).

Según Zhou X. la exposición al agonista NMDA no siempre provoca la activación global de NMDARs. Una dosis baja de NMDA ($<15 \mu\text{M}$) principalmente activa NMDARs sinápticos y presenta un efecto protector mientras que la mayoría de los NMDARs extrasinápticos solamente son activados por elevados niveles de NMDA ($>20 \mu\text{M}$). De manera que se requieren dosis elevadas de NMDA para inducir coactivación y causar excitotoxicidad (Zhou et al., 2015b) (Figura 7).

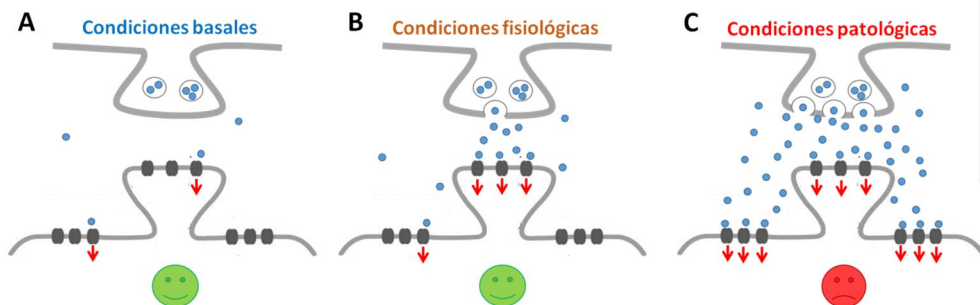


Figura 7. Representación de la activación de los NMDARs en diferentes condiciones. A)

En condiciones de reposo la concentración extracelular de glutamato activa algunos receptores sinápticos y receptores extrasinápticos de alta sensibilidad. **B)** En condiciones fisiológicas, el glutamato liberado por el terminal presináptico activa receptores sinápticos. **C)** En condiciones patológicas, la liberación masiva de glutamato produce una coactivación significativa de receptores sinápticos y extrasinápticos. Una coactivación de poca duración, durante una actividad cerebral intensa o un episodio isquémico breve, no necesariamente conduce a muerte neuronal significativa. *Adaptada de Zhou X et al. The Neuroscientist. 2014 (Zhou et al., 2015b).*

Se ha demostrado que los antagonistas selectivos de la subunidad NR2B son neuroprotectores en modelos de isquemia cerebral y otras enfermedades neurodegenerativas (Zhou and Baudry, 2006; DeRidder et al., 2006; Liu et al., 2007; von Engelhardt et al., 2007; Chen et al., 2008), mientras que antagonistas selectivos de NR2A prácticamente no presentan efecto neuroprotector y en algunos estudios incluso incrementan la muerte neuronal (DeRidder et al., 2006; Liu et al., 2007; Chen et al., 2008).

En su estudio, Zhou et al. observaron que a dosis bajas de NMDA (NMDA 10-20 μM) tanto los antagonistas de NR2A como los de NR2B reducían la muerte neuronal, aunque la inhibición de los NR2B otorgaba una protección mayor. En cambio, en condiciones de daño excitotóxico (NMDA 100 μM) solamente los inhibidores de las subunidades NR2B eran neuroprotectores. Estos datos apoyan la hipótesis que es la coactivación de ambos tipos de receptores y la intensidad de la exposición lo que determina la muerte neuronal excitotóxica (Zhou et al., 2013; Zhou et al., 2015b).

Aunque no se ha alcanzado un acuerdo general respecto a si es la activación de receptores extrasinápticos o bien la co-activación de ambos tipos de receptores la responsable de la muerte neuronal en la isquemia cerebral, sí que existe la idea compartida de que el bloqueo de NMDARs extrasinápticos constituiría una intervención terapéutica potencial para proteger a las neuronas de la excitotoxicidad (Chen et al., 2014c).

2.2.3. Vías de señalización diferenciales entre NMDARs sinápticos y extrasinápticos: papel sobre CREB

La entrada de Ca^{2+} a través de NMDARs sinápticos activa vías de supervivencia neuronal induciendo la activación de genes de supervivencia y suprimiendo genes de muerte celular (Hardingham and Bading, 2010; Benarroch, 2011). Por otro lado, estudios recientes han demostrado que ciertas vías de señalización de muerte celular o ciertos eventos dañinos son activados preferentemente por NMDARs extrasinápticos. En algunos casos esto supone un antagonismo directo de las vías activadas por los NMDARs sinápticos mientras que en otros conlleva la activación de eventos o vías no activadas por los receptores sinápticos (Hardingham and Bading, 2010).

La entrada de Ca^{2+} a través de NMDARs sinápticos activa la cascada Ras-ERK (Figura 8) (Hardingham et al., 2003; Thomas and Huganir, 2004; Sweatt, 2004). Esta entrada de Ca^{2+} provoca un incremento de Ras-GTP que conduce a la activación de la *mitogen activated protein kinase (MAPK)/ERK kinase* (MEK) y de la *extracellular signal-regulated kinase* (ERK). Tras su activación, ERK fosforila dianas citoplasmáticas como las ribosomal protein S6 kinases (RSKs). Una parte de las ERK y RSKs activadas translocan al núcleo donde ERK fosforila y activa a las *mitogen and stress-activated kinases* (MEKs). En el núcleo, ERKs, RSKs y MSKs fosforilan varios sustratos. Entre estos sustratos el más caracterizado es el *cyclic-AMP-responsive element (CRE)-binding protein* (CREB) que puede ser fosforilado por MSKs o RSKs (Thomas and Huganir, 2004). Por otro lado, la entrada de Ca^{2+} a

través de NMDARs sinápticos activa a la Ca^{2+} -calmodulin (CaM) kinase CaMKIV nuclear (Hardingham et al., 2001). La CaMKIV media la fosforilación de CREB en los primeros segundos de la entrada de Ca^{2+} , en los puntos temporales intermedios juntamente con la vía ERK contribuye a la fosforilación de CREB y finalmente es la vía ERK la que prolonga la fosforilación de CREB, necesaria para permitir una activación robusta de la expresión génica dependiente de CREB (Hardingham et al., 2001; Wu et al., 2001; Impey et al., 2002). La fosforilación de CREB en el residuo Ser-133 es necesaria para reclutar a la *CREB-binding protein* (CBP). Sin embargo, se requiere también la fosforilación de CBP por CaMKIV para activarla, permitir su unión a CREB e iniciar la transcripción dependiente de CREB/CBP (Figura 8) (Hardingham et al., 2001; Wu et al., 2001; Impey et al., 2002).

CREB es un factor de transcripción con un papel importante en supervivencia neuronal, así como en otros procesos que incluyen plasticidad sináptica, neurogénesis, aprendizaje y memoria (Lonze et al., 2002; Mantamadiotis et al., 2002; Carlezon et al., 2005).

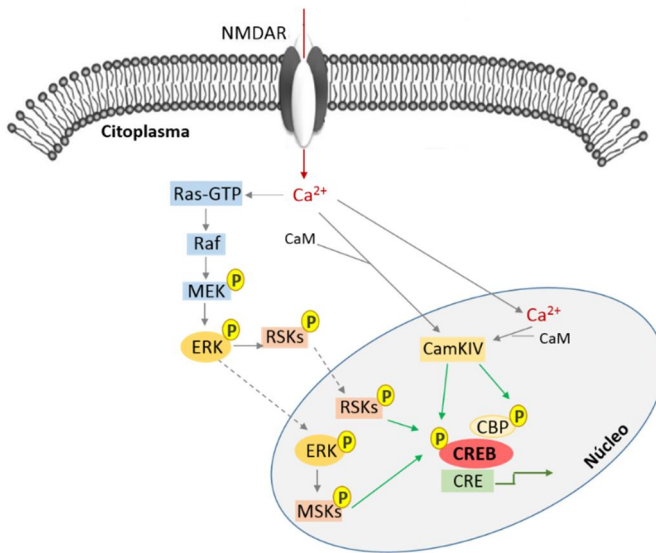


Figura 8. Activación de CREB a través de NMDARs. La entrada de Ca^{2+} a través de NMDARs sinápticos activa Ras-GTP que conduce a la activación de MEK, que a su vez fosforila y activa a ERK. Tras su activación, ERK fosforila a las RSKs y una parte de las ERK y RSKs activadas translocan al núcleo donde ERK fosforila y activa a las MEKs. Las RSKs y MSKs pueden fosforilar el residuo Ser-133 del factor de transcripción CREB. Por otro lado, la entrada de Ca^{2+} a través de estos NMDARs sinápticos activa a la CaMKIV nuclear. La CaMKIV media la fosforilación de CREB en los primeros segundos de la entrada de Ca^{2+} , en los puntos temporales intermedios juntamente con la vía ERK contribuye a la fosforilación de CREB y finalmente es la vía ERK la que prolonga la fosforilación de CREB, necesaria para permitir la activación de la expresión génica dependiente de CREB. La fosforilación de CREB en Ser-133 es necesaria para reclutar a la CBP previamente fosforilada y activada por CaMKIV.

Entre los genes promotores de supervivencia que se encuentran sobreexpresados por CREB, el más caracterizado y crítico para la señalización de supervivencia mediada por NMDARs/CREB es BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) (Hardingham et al., 2002; Lau and Bading, 2009; Leveille et al., 2010). Aparte del conjunto de genes que se encuentran directamente regulados por CREB, este factor de transcripción también puede contribuir a la señalización de supervivencia de los NMDARs sinápticos regulando la expresión de otros factores de transcripción, entre ellos ATF3 (*activating transcription factor 3*) que actúa como represor de la transcripción de genes que señalizan a muerte celular, protegiendo así a las neuronas frente a la muerte isquémica *in vitro* e *in vivo* (Zhang et al., 2011).

Se ha determinado que la activación de los NMDARs sinápticos promueve una actividad sostenida de la vía Ras-ERK (Chandler et al., 2001; Papadia et al., 2005) y que los NMDARs sinápticos formados por la subunidad NR2A son los principales responsables de la expresión génica dependiente de BDNF, en cambio los receptores sinápticos formados por NR2B no afectan a la expresión génica de BDNF (Chen et al., 2007). Por otro lado, la coactivación de NMDARs sinápticos y extrasinápticos conduce a la inhibición de esta cascada de señalización (Chandler et al., 2001) (Kim et al., 2005; Leveille et al., 2008) (Figura 9). En cultivos neuronales se ha observado que cuando se produce la activación de ambos tipos de receptores, sinápticos y extrasinápticos, la vía extrasináptica domina sobre la sináptica resultando en una débil activación de CREB (Hardingham et al., 2002; Hardingham, 2006a). Se ha propuesto la existencia de una transición en la función de NMDARs-NR2B sobre ERK durante el desarrollo; en neuronas inmaduras la estimulación de NMDARs-NR2B induciría una activación sostenida de ERK mientras que en neuronas maduras (en las que los niveles de NR2B han disminuido y se han localizado preferencialmente en zonas extrasinápticas) los NMDARs-NR2B inhibirían la activación de esta vía (Kim et al., 2005). Se ha sugerido que la regulación negativa de la actividad de ERK mediante la activación de NMDARs extrasinápticos podría ser uno de los primeros eventos en señalización que determinen daño cerebral (Ivanov et al., 2006) y por ello constituye un buen candidato para nuevas aplicaciones farmacológicas.

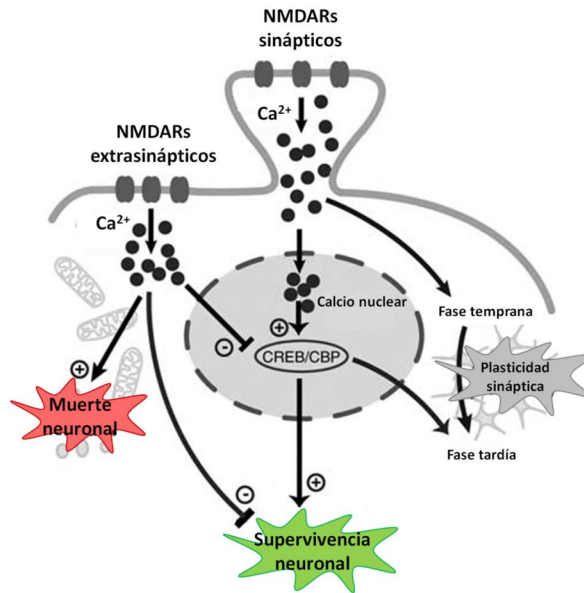


Figura 9. Efecto de la activación de NMDARs sinápticos o extrasinápticos sobre la vía ERK-CREB. La entrada de Ca^{2+} a través de NMDARs sinápticos activa la vía ERK-CREB, induciendo la expresión de genes de supervivencia regulados por CREB y permitiendo la plasticidad sináptica. En cambio, la entrada de Ca^{2+} a través de NMDARs extrasinápticos inhibe la vía ERK-CREB y la supervivencia neuronal inducida por NMDARs sinápticos, produciendo muerte neuronal. *Adaptada de Bading H. (Bading, 2015)*

Además, la activación de NMDARs sinápticos actúa también sobre la proteína serina/treonina kinasa Akt (Zhang et al., 1998; Bhave et al., 1999; Lafon-Cazal et al., 2002). Se ha determinado que la estimulación de la vía PI3K/Akt (PI3K, fosfoinosítide 3-kinase) es neuroprotectora frente la muerte neuronal excitotóxica *in vitro* e *in vivo* y que su inhibición incrementa la muerte neuronal (Noshita et al., 2001; Noshita et al., 2003; Soriano et al., 2006). La activación de NMDARs-NR2A también está asociada a fosforilación de *c-jun-N-terminal kinase* (JNK), neuroprotectora en cultivos neuronales sometidos a daño excitotóxico (Choo et al., 2012).

Por otro lado, la sobreestimulación de NMDARs extrasinápticos inhibe la actividad de Akt (Noshita et al., 2001; Noshita et al., 2003; Soriano et al., 2006) y dispara la acumulación de Ca^{2+} en la mitocondria asociada a muerte neuronal (Choo et al., 2012). La activación de NMDARs extrasinápticos también provoca la activación de

la calpaína, efecto no observado mediante la activación de NMDARs sinápticos (Lynch and Guttman, 2002, Doshi and Lynch, 2009). Entre los sustratos de la calpaína se encuentra el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX3), la fosfatasa STEP (*striatal-enriched protein tyrosine phosphatase*) e incluso las propias subunidades NR2A y NR2B de los NMDARs (Bi et al., 1998; Guttman et al., 2001; Gascon et al., 2008; Xu et al., 2009).

Con estos antecedentes, la señalización antagónica entre NMDARs sinápticos y extrasinápticos provee una nueva base conceptual para el desarrollo de futuras terapias neuroprotectoras que potencien el efecto de la actividad sináptica y disrumpan la señalización de muerte dependiente de los NMDARs extrasinápticos.

2.2.4. Moduladores del extremo C-terminal de las subunidades NR2A y NR2B

Se ha observado que la delección genética de los dominios C-terminal de las subunidades de los NMDARs induce varios de los efectos que se observan tras la delección del receptor completo (Sprengel et al., 1998). Consistente con la idea de que los NMDARs ejercen su señalización mediante los extremos C-terminal de sus distintas subunidades (Sprengel et al., 1998; Foster et al., 2010), Martel y cols. observaron que el reemplazo del extremo C-terminal de NR2B por el de NR2A protegía de la excitotoxicidad mediada por la activación de los NMDARs *in vitro* e *in vivo*. En cambio el reemplazo del extremo C-terminal de NR2A por el de NR2B convertía al NMDAR-NR2A en excitotóxico (Martel et al., 2012).

Ambas subunidades contienen en su extremo C-terminal un motivo PDZ que interacciona con proteínas que se unen al dominio PDZ de algunas proteínas quinasas que transducen señales que en conjunto se llaman MAGUK (*membrane-associated guanylate kinases*) y entre las cuales encontramos PSD-93, PSD-95, SAP97 y SAP-12 (Sans et al., 2000; Al-Hallaq et al., 2007). La unión a estas proteínas de soporte es uno de los factores que regulan la expresión en superficie y la función de los NMDARs (Lavezzari et al., 2003; Kim and Sheng; 2004;

Sornarajah et al., 2008; Roche et al., 2001). La estabilidad de los NMDARs también depende de las interacciones con el citoesqueleto, ya sean interacciones directas mediante la interacción con α -actinina (Wyszynski et al., 1997; Dunah et al., 2000) o espectrina (Wechsler and Teichberg, 1998) o indirectas a través de proteínas como PSD95 (Wyszynski et al., 1997). Cambios en el citoesqueleto pueden facilitar la difusión lateral de los receptores y permitir un intercambio rápido entre zonas de membrana (Newpher and Ehlers, 2009).

Existen diferencias respecto a las modificaciones postraduccionales a las que está sujeta cada una de las subunidades. Entre ellas encontramos la palmitoilación, la nitrosilación y la fosforilación, la última de las cuales ha sido la más caracterizada (Chen and Roche, 2007). El equilibrio entre fosforilación (por quinasas) y defosforilación (por fosfatasas) puede regular la permeabilidad del canal NMDAR a Ca^{2+} así como su expresión en la superficie celular (Skeberdis et al., 2006). Proteínas quinasas como PKA (*Protein kinase A*), PKC (*Protein kinase C*) y varias *tyrosine kinases* (Fyn y Src) actúan sobre ambas subunidades aunque difieren en los residuos que fosforilan y en las consecuencias de su fosforilación (Sanz-Clemente et al., 2013).

Además, la localización de NMDARs sinápticos y extrasinápticos puede ser regulada mediante la proteólisis del extremo C-terminal por la proteasa activada por Ca^{2+} , calpaína (Doshi and Lynch, 2009). La entrada masiva de Ca^{2+} provocada por la sobreactivación de NMDARs conduce a la activación de la calpaína neuronal (Calpaína I), sin afectar a la calpaína II que se encuentra extendida a todas las células cerebrales (Siman and Noszek, 1988; Gascon et al., 2008). Esta activación constituye el principal mecanismo por el que se produce proteólisis en el cerebro tras la hipoxia o la isquemia cerebral (Arai et al., 1991; Lee et al., 1991). Las subunidades NR2A, NR2B y NR2C, pero no NR1, son proteolizadas por calpaína aunque solamente se conoce el punto de corte en la subunidad NR2A (Bi et al., 1998; Guttman et al., 2001).

La proteólisis por calpaína del extremo C-terminal de la subunidad NR2B eliminaría varios dominios regulatorios incluyendo motivos de internalización como el dominio YELK (Roche et al., 2001) así como dominios de unión para proteínas de citoesqueleto (Wyszynski et al., 1997; Krupp et al., 1999) y proteínas de soporte como PSD95 (Figura 10) (Niethammer et al., 1996). Sin embargo, aunque existe cierta controversia, parece ser que las propiedades básicas del canal iónico y el flujo de calcio no estarían afectadas por la pérdida del extremo C-terminal (Guttman et al., 2001) y se ha hipotetizado que los NMDARs proteolizados se mantendrían funcionales en la superficie celular (Simpkins et al., 2003; Wu et al., 2007). De manera que la calpaína no ejercería un efecto degradativo sino que crearía nuevos receptores con nuevas propiedades basadas en la disociación de la actividad del canal con proteínas en el extremo C-terminal (Wu et al., 2007).

De forma consistente con el papel de la subunidad NR2B en la excitotoxicidad, la activación de calpaína mediada por NMDARs se bloquea con antagonistas selectivos para NR2B pero no por antagonistas que inhiben preferentemente NR2A (Zhou and Baudry, 2006; DeRidder et al., 2006; Gascon et al., 2008).

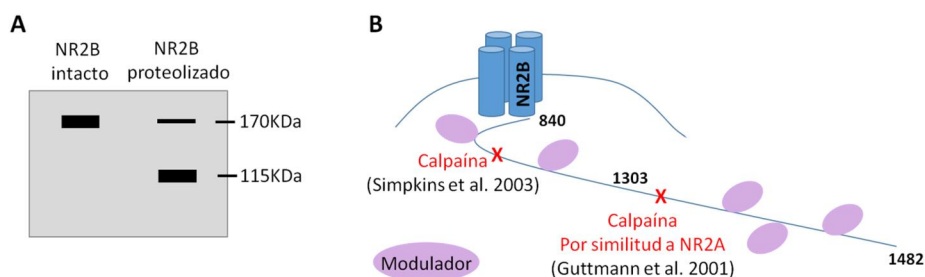


Figura 10. Proteólisis de la subunidad NR2B por calpaína. **A)** Modelo representativo de las bandas correspondientes a la subunidad NR2B en un western blot. Los NMDAR-NR2B intactos presentan una banda de 170 KDa correspondiente al receptor completo mientras que en el caso de los NMDA-NR2B cortados por calpaína, se observa la disminución de la banda de 170 KDa acompañada de la aparición de una banda de 115 KDa correspondiente al receptor proteolizado. **B)** Predicción de los puntos de corte por calpaína en el extremo C-terminal de NR2B según Simpkins (Simpkins et al. 2003) o según el punto de corte por calpaína determinado para la subunidad NR2A. La proteólisis del extremo C-terminal de NR2B provoca la pérdida de unos u otros moduladores, en función del lugar donde se produzca el corte por calpaína.

Los NMDARs sinápticos han sido ampliamente estudiados y se conocen muchas moléculas implicadas en su señalización a través del extremo C-terminal. En cambio, el conocimiento sobre señalización a través del extremo C-terminal de los NMDARs extrasinápticos es más reducido. Actualmente se conoce la interacción/modulación del extremo C-terminal de NR2B con/por las siguientes proteínas:

Quinasas y fosfatasas

Death-associated protein kinase 1 (DAPK1): La entrada de Ca^{2+} a través de NMDARs inducida por la isquemia cerebral activa DAPK1, que a su vez se une al extremo C-terminal de la subunidad NR2B. Esta interacción NR2B-DAPK1 conduce a la fosforilación de NR2B en el residuo Ser-1303 potenciando la conductividad del canal e incrementando el flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la neurona, promoviendo de este modo la excitotoxicidad (Shamloo et al., 2005; Tu et al., 2010)

Ca²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII): CaMKII es una proteína serina-treonina quinasa altamente enriquecida en la región de PSD. En cultivos neuronales se ha observado que CaMKII coimmunoprecipita de forma preferente con NR2B, presentando una unión 10 veces más fuerte a NR2B que a NR2A (Colbran, 2004; Gardoni et al., 2006). La entrada de Ca^{2+} a través de NMDARs induce la autofosforilación de CaMKII resultando en una activación que persiste incluso cuando los niveles de Ca^{2+} intracelular vuelven a su estado basal (Strack and Colbran, 1998; Otmakhov et al., 2004; Fan et al., 2014). Una vez activada, rápidamente interacciona con los aa 839-1120 y 1290-1310 del extremo C-terminal de la subunidad NR2B (Strack and Colbran, 1998; Fan et al., 2014; Otmakhov et al., 2004). CamKII fosforila a la subunidad NR2B en el residuo Ser-1303 y la defosforilación por la proteína fosfatasa 1 (PP1, *protein phosphatase 1*) o la proteína fosfatasa 2A (PP2A, *protein phosphatase 2A*) limita la sobreactivación de NMDARs y promueve vías de supervivencia (Farinelli et al., 2012; Strack et al., 1998; Mao et al., 2014).

Protein Kinase C (PKC): PKC fosforila a las subunidades NR1, NR2A y NR2B potenciando la función del canal NMDAR. La fosforilación de NR2B se produce en el residuo Ser-1303 y la defosforilación por la protein phosphatase 1 (PP1) limita la sobreactivación de NMDARs (Prabhu Ramya et al., 2012; Jones and Leonard, 2005). La fosforilación de PKC en el residuo Ser-1303 regula a los NMDARs de forma diferente que la fosforilación de CamKII en el mismo residuo (Chen and Roche, 2007).

Casein Kinase 2 (CK2): CK2 fosforila el residuo Ser-1480 del extremo C-terminal de NR2B impidiendo de este modo la interacción de PSD95 y SAP102 con NR2B. Como consecuencia se produce la endocitosis de los NMDARs-NR2B presentes en la sinapsis, incrementando así el contenido sináptico de NR2A (Chung et al., 2004; Sanz-Clemente et al., 2010). Se cree que CK2 participa en el reemplazo de NMDARs-NR2B sinápticos por NMDARs-NR2A que se produce durante el desarrollo (Zhang et al., 2008; Sanz-Clemente et al., 2010).

Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5): Cdk5 fosforila el residuo Ser-1116 de la subunidad NR2B reduciendo su presencia en la superficie celular (Plattner et al., 2014).

Fyn (Src family of tyrosine protein kinases): La proteína quinasa Fyn requiere la unión con PSD95 unida a NR2B para fosforilar el extremo C-terminal de esta subunidad. La fosforilación del residuo Tyr-1472 (motivo YEKL, aa 1472-1475) por Fyn impide la unión del complejo de internalización AP2 y mantiene así al receptor en la superficie celular (Prybylowski et al., 2005). Además, Fyn también fosforila el residuo Tyr-1336 de NR2B facilitando la proteólisis de NR2B por calpaína en receptores localizados en membrana. En este caso también la unión de Fyn a PSD95 facilita la fosforilación en Tyr-1336, aunque se requiere la disociación posterior de PSD95 para que la fosforilación facilite la acción de la calpaína (Dong et al., 2004; Wu et al., 2007). También se ha descrito fosforilación de Fyn en el residuo Tyr-1252 pero esta fosforilación prácticamente no se observa en cultivos neuronales (Nakazawa et al., 2001).

Phosphoinositide 3-kinase (PI3K): El incremento de fosforilación de los NR2B que ocurre tras un episodio isquémico incrementa la interacción con NMDAR-PI3K (Takagi et al., 2003). El dominio SH2 de la PI3k se une al residuo Tyr-1336 fosforilado del C-terminal de la subunidad NR2B y protege frente a la muerte neuronal (Takagi et al., 2003).

Protein tyrosine phosphatase (PTP1D): La interacción de PTP1D con NR2B interviene en la cascada de señalización de NR2B mediada por BDNF en la densidad postsináptica (Lin et al., 1999).

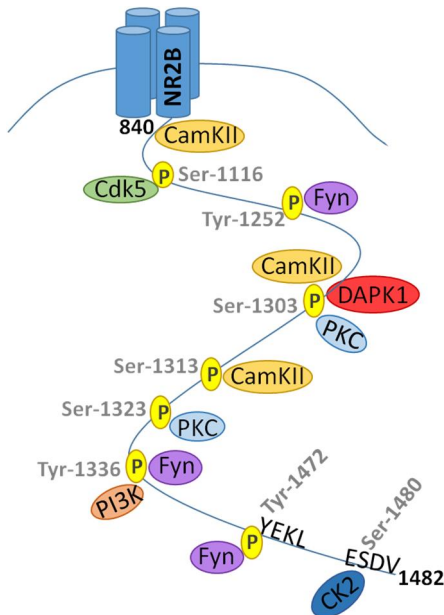


Figura 11. Esquema de las fosforilaciones que tienen lugar en el extremo C-terminal de la subunidad NR2B de los NMDARs.

Proteínas de unión al dominio PDZ de NR2B

GAIP/RSG19-interacting protein (GIPC): Se ha determinado que en cultivos de neuronas hipocámpales, GIPC se une a la subunidad NR2B en el dominio PDZ tanto en la membrana plasmática, donde lo estabiliza, como en el citoplasma una vez internalizado, acompañando al NMDAR-NR2B durante el reciclaje y exocitosis (Yi et al., 2007).

Postsynaptic density-95 (PSD95/SAP-90): PSD95 es una guanilato-quinasa asociada a membrana (MAGUK) concentrada en las sinapsis glutamatérgicas e involucrada en la estabilización y plasticidad sináptica. Es una proteína organizadora que acopla a los NMDARs a proteínas intracelulares y enzimas de señalización (Sheng, 2001). Todas las subunidades de los NMDARs se unen directamente a PSD95 (Kornau et al., 1995). Tras la exposición a un estímulo excitotóxico o evento isquémico, PSD95 unida a la nNOS interacciona con NR2B, posicionando a nNOS para que sea activada de forma eficiente por el Ca^{2+} que entra a través de NMDAR promoviendo la generación de óxido nítrico (NO), conduciendo de este modo a un incremento de la muerte neuronal. La administración, previa o posterior al evento isquémico, de un péptido que disrumpe esta interacción NR2B-PSD95 reduce la muerte neuronal en modelos de ictus *in vitro*, *in vivo* en ratas y primates (Aarts et al., 2002; Sun et al., 2008) y en humanos (Hill et al., 2012) sin interferir en la señalización de supervivencia de CREB (Soriano et al., 2008).

Synapse-associated protein-97 (SAP97) y Postsynaptic density-93 (PSD93): Ambas MAGUKs interaccionan con las subunidades NR2B y NR2A (Sans et al., 2000; Wang et al., 2005; Al-Hallaq et al., 2007).

Synapse-associated protein-102 (SAP102): SAP102, miembro de la familia MAGUK, presenta una elevada expresión en las sinapsis de ratas jóvenes y durante el desarrollo sus niveles disminuyen. Se ha determinado interacción con el dominio PDZ de la subunidad NR2B, interacción que se reduce a medida que los NMDARs-NR2B sinápticos van siendo reemplazados por NMDARs-NR2A durante el desarrollo (Muller, 1996 #248; Sans et al., 2000).

Proteínas de citoesqueleto

α -actinin 2: α -actinina 2 se une a la subunidad NR2B y a actina. La entrada de Ca^{2+} a través de NMDARs provoca la despolimerización de F-actina e inhibe la

interacción con NMDAR a través de una inhibición competitiva de la unión de α -actinina 2 por Ca^{2+} -CaM (Wyszynski et al., 1997; Sattler et al., 2000).

Spectrin: La espectrina cerebral interacciona con el extremo C-terminal de las subunidades NR1, NR2A y NR2B, conectándolas a filamentos de actina (Wechsler and Teichberg, 1998).

Otras proteínas

Ras-Guanine Nucleotide-Releasing Factor 1 (Ras-GRF1): Ras-GRF1 interacciona con NR2B en los aa 886-1310 del extremo C-terminal y activa la vía *p38-MAP kinase* (Krapivinsky et al., 2003; Fan et al., 2014; Li et al., 2006).

Synaptic Ras GTPase-activating protein (SynGAP): La estimulación de NMDARs-NR2B conduce a la asociación preferente de SynGAP con NR2B y la consiguiente inhibición de la cascada de señalización Ras-ERK. No se ha determinado si se trata de una interacción directa o si SynGAP se une a NR2B mediante miembros de la familia PSD95 o CaMKII (Fan et al., 2014; Kim et al., 2005).

Dopamine receptor D2 (D2R): En neuronas estriatales, la activación de D2R promueve la interacción entre el extremo C-terminal de NR2B y D2R provocando la disociación de NR2B-CaMKII y reduciendo la corriente a través del canal NMDAR (Fan et al., 2014; Liu et al., 2006).

Striatal-enriched protein tyrosine phosphatase (STEP): En cultivos de neuronas corticales se ha observado que la estimulación sináptica conduce a la ubiquitinización y degradación de STEP61, prolongando la activación de ERK. En cambio, la estimulación de receptores NMDARs-NR2B provoca la proteólisis por calpaína de STEP61 provocando la defosforilación de las proteínas señalizadoras de supervivencia ERK y CREB (Xu et al., 2009; Poddar et al., 2010).

Adaptor protein complex 2 (AP-2): El dominio C-terminal de NR2B contiene un motivo de internalización YEKL. YELK es el dominio de unión de AP-2 para

proceder a la internalización del NMDAR-NR2B mediante endocitosis dependiente de clatrina. Cuando Fyn, mediante la unión a PSD95, fosforila el residuo Tyr-1472 de la subunidad NR2B, AP-2 no puede unirse y el receptor se mantiene en la membrana celular (Roche et al., 2001; Prybylowski et al., 2005; Zhang et al., 2008).

Phospholipase C gamma (PLC-gamma): PLC-gamma interacciona con las subunidades NR2A y NR2B mediante su dominio SH2 conectándolas a vías de señalización (Gurd and Bissoon, 1997).

Collapsin response mediator protein (CRMP2/DRP2): CRMP2 es un mediador intracelular que promueve el crecimiento axonal regulando el ensamblaje de microtúbulos (Inagaki et al., 2001; Fukata et al., 2002). Se ha descrito que la isquemia cerebral provoca la proteólisis de CRMP2 por calpaína y este CRMP2 proteolizado se une preferentemente al dominio C-terminal de NR2B provocando su internalización y reduciendo así la neurotoxicidad (Bretin et al., 2006; Brittain et al., 2011).

Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1): Se ha observado en cortes de hipocampo, que RACK1 interacciona con NR2B y Fyn impidiendo la fosforilación de NR2B por Fyn y reduciendo la corriente a través del canal NMDAR (Yaka et al., 2002).

2.3. Antagonistas de los NMDARs

Debido a la importancia de los NMDARs en el daño neuronal excitotóxico tras el ictus isquémico, se han desarrollado antagonistas de estos receptores con el objetivo de impedir la muerte neuronal tras la isquemia cerebral. Se ha determinado que los antagonistas de los NMDARs reducen el tamaño de infarto y el déficit neurológico en modelos animales de isquemia cerebral focal, pero en los estudios clínicos realizados estos antagonistas han mostrado efectos adversos, entre ellos efectos cardiovasculares y psiquiátricos (Davis et al., 1997; Ikonomidou

et al., 2000; Lees et al., 2001). Entre los antagonistas testados, *selfotel*, antagonista competitivo de los NMDARs que actúa en el sitio de unión de glutamato, no superó la fase II al incrementar la mortalidad y presentar una elevada incidencia de efectos psiquiátricos adversos (Grotta et al., 1995; Davis et al., 1997). De forma similar, *dextrorphan HCl* no superó la fase I al no presentar efectos beneficiosos y debido a sus efectos secundarios (Albers et al., 1995). Por otro lado, *Gavestinel* o *Licostinel*, mostraron una buena tolerancia en fase III y I respectivamente, pero no mostraron mejoras en la mortalidad ni en la morbilidad (Lees et al., 2000; Sacco et al., 2001) (Albers et al., 1999).

El fracaso de los antagonistas de los NMDARs en ensayos clínicos se ha asociado al bloqueo no exclusivo de NMDARs extrasinápticos, afectando también a las funciones fisiológicas de los NMDARs. Tras el fracaso de estos antagonistas y dado el papel esencial de los NMDARs–NR2A en la función neuronal y señalización a supervivencia, se planteó la inhibición selectiva de los NMDARs–NR2B y de sus vías de señalización. De hecho, en la última década, la subunidad NR2B se ha convertido en uno de los focos de atención en el tratamiento de daño cerebral. Un antagonista de la subunidad NR2B, ifenprodil, es efectivo en cultivos neuronales y reduce el volumen de infarto en modelos de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO, *middle cerebral artery occlusion*) (Graham et al., 1992; Wang and Shuaib, 2005; von Engelhardt et al., 2007; Chen et al., 2008) sin presentar los efectos secundarios comúnmente observados en los antagonistas de NMDARs convencionales (Jackson and Sanger, 1988; Blanchet et al., 1999). La segunda generación de análogos de ifenprodil, Ro25-6981 y taxoprodil, presentan una mayor selectividad por la subunidad NR2B que el ifenprodil (Fischer et al., 1997; Gogas, 2006) sugiriendo una menor probabilidad de efectos secundarios. Sin embargo, los resultados de eficacia de taxoprodil en la fase aguda del ictus no mostraron diferencias con el grupo placebo y actualmente se encuentra en fase II de un estudio clínico con pacientes de Parkinson (Trials, 2015). Otros inhibidores selectivos como *fluoxetine* presentan acciones neuroprotectoras

independientemente de sus efectos antidepresivos (Kiss et al., 2012; Vizi et al., 2013).

Sin embargo, aunque los inhibidores de NR2B evitan el bloqueo de los NR2A y parecen no provocar efectos secundarios, estos antagonistas podrían tener ciertas limitaciones clínicas. En primer lugar, aparte de su papel en la excitotoxicidad, los NMDARs-NR2B también tienen funciones fisiológicas como a respuesta al estrés o creación de nueva memoria. De modo que incluso el antagonista más selectivo podría mostrar efectos adversos en las dosis necesarias para el tratamiento de los pacientes. En segundo lugar, igual que los antagonistas no selectivos, estos compuestos solamente son efectivos cuando se administran inmediatamente después del ictus, perdiendo rápidamente su eficacia a medida que el tratamiento se retrasa (Liu et al., 2007).

Con el objetivo de sortear estas limitaciones, estudios recientes han intentado actuar sobre señales de muerte situadas por debajo de los NMDARs. De este modo se podrían desarrollar terapias tan efectivas como los antagonistas de NMDARs pero sin sus efectos secundarios y se podría mantener su eficacia incluso cuando se retrasa el tratamiento. Un gran número de estudios han intentado identificar los mecanismos de señalización que conducen a muerte excitotóxica por sobreactivación de NMDARs, y especialmente proteínas que actúen por debajo de los NMDARs para tratar de aclarar los mecanismos por los que estos eventos contribuyen a la muerte neuronal excitotóxica tras el ictus isquémico (Aarts et al., 2002; Cook et al., 2012; Mao et al., 2013; Pei et al., 2014; Wang et al., 2014; Zhou et al., 2015a). Las vías de señalización mediadas por la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), DAPK1, *phosphatase and tensin homolog located on chromosome 10* (PTEN) y CamKII se han asociado a la activación de NMDARs-NR2B (Sun et al., 2015).

Una de las estrategias dirigida a impedir la interacción NR2B-PSD95-nNOS mediante la administración de un péptido que contiene los 9 residuos terminales de la subunidad NR2B (Tat-NR2B9c) protege a las neuronas de la excitotoxicidad,

reduce el daño isquémico cerebral en animales y mejora su función neurológica (Aarts et al., 2002; Sun et al., 2008; Cook et al., 2012; Zhou et al., 2015a). Además, este péptido ha mostrado ser seguro y efectivo tras la reparación endovascular del aneurisma en el tratamiento de pacientes con ictus iatrogénico (Hill et al., 2012). También la administración de un péptido que impide la translocación de PTEN al núcleo protege frente al daño cerebral y mejora la recuperación funcional (Mao et al., 2013; Zhang et al., 2013b). La administración 1 h tras la oclusión de un péptido que inhibe la asociación CamKII-NR2B reduce el volumen de infarto en modelos animales (Vest et al., 2010).

Por otro lado, la interacción de DAPK1 con p53 conduce a apoptosis (Chi, 2014) y la disrupción de la interacción DAPK1-p53 se ha mostrado protectora frente al daño isquémico (Pei et al., 2014; Wang et al., 2014). Se ha determinado que la interacción de DAPK1 con DANGER inhibe la actividad de DAPK1 (Kang et al., 2010). La asociación de DAPK1 y PKD inducida por el estrés oxidativo activa la c-Jun N-terminal kinase (JNK) y provoca necrosis (Eisenberg-Lerner and Kimchi, 2007). Además, DAPK1 fosforila a la proteína beclin-1 y promueve la inducción de autofagia (Zalckvar et al., 2009), que también puede ser provocada por p53 (Crighton et al., 2006). Se ha sugerido que la actuación sobre estas proteínas puede ser una estrategia efectiva para intervenir en la señalización a muerte de la vía NR2B-DAPK1 (Sun et al., 2015). Sin embargo existen ciertos problemas que todavía no se han resuelto. Uno de ellos es que tanto DAPK1 como p53 son supresores de tumores por lo que antes de actuar sobre ellas habría que estudiar cuidadosamente los efectos de una proliferación celular incrementada. En segundo lugar, la relación NR2B-DAPK1-JNK aún tiene que ser confirmada. Finalmente, aún se tiene que aclarar el papel de la autofagia en la isquemia y si un incremento de los niveles de autofagia induciría muerte neuronal tras un episodio de ictus (Figura 12) (Sun et al., 2015).

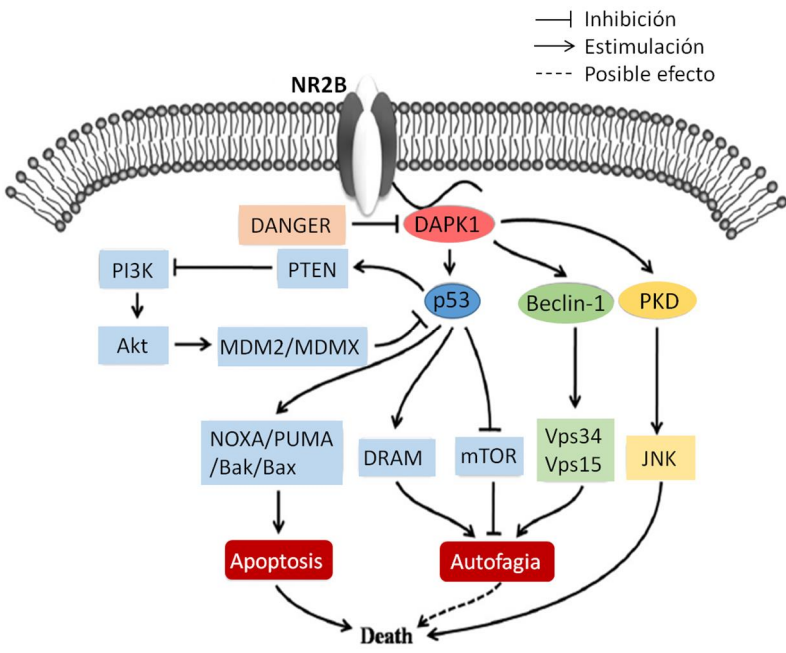


Figura 12. Vía de señalización NR2B-DAPK1. La isquemia cerebral recluta DAPK1 al extremo C-terminal de la subunidad NR2B y potencia su actividad. DANGER es un inhibidor de DAPK1. DAPK1-p53 constituye una conocida vía de señalización a muerte celular. La vía PKD-JNK, así como la autofagia inducida por beclina-1 y p53 podrían ser vías alternativas para la transducción de las señales a muerte de DAPK1. *Imagen adaptada de Sun Y 2015 (Sun et al., 2015).*

En la siguiente tabla se detallan los estudios realizados sobre estas vías de señalización que han mostrado efectividad *in vivo* (Tabla 1).

Tabla 1. Estudios experimentales *in vivo* realizados sobre vías de señalización asociadas a la subunidad NR2B que han mostrado resultados prometedores. Adaptada de Sun Y 2015 (Sun et al., 2015).

Mecanismo	Fármacos potenciales	Animales	Modelo	Tiempo de administración
Disrupción NR2B-PSD95	Tat-NR2B9c	Rata	MCAO	1 h tras la oclusión
		Macaco	IE	1 h tras el procedimiento embólico
		Humanos	II	Al finalizar la reparación del aneurisma
Disrupción NR2B-PSD95	Tat-HA-NR2B9c	Rata	MCAO	4 días tras la oclusión
Disrupción NR2B-PSD95-nNOS	Tat-N-dimer	Ratón	MCAO	30 min tras la oclusión
Disrupción PSD95-nNOS	ZL006	Ratón	MCAO	1 o 3 h tras la oclusión
Disrupción PSD95-nNOS	Honokiol	Rata	MCAO	0, 1 o 3 h tras la reperusión
Disrupción PSD95-nNOS	PPBP	Cerdo	II	5 min tras la recuperación
Disrupción PSD95-nNOS	Tramiprosate	Rata	MCAO	2, 4 o 6 h tras la oclusión
Disrupción PSD95-nNOS	LV-Homer1a	Ratón	NMDA	7 días antes de la inyección de NMDA
Inhibición de nNOS	TRIM	Rata	MCAO	5 o 90 min tras la oclusión
Inhibición de nNOS	7-NI	Rata	MCAO	5min tras la oclusión
Disrupción nNOS-CAPON	Tat-GESV	Rata	II	Tras la oclusión carotídea
Atrapador de peroxinitrito	Baicalin	Rata	MCAO	Al inicio de la reperusión
Reducción de la degradación de STEP	Tat-STEP	Rata	MCAO	6 h tras la oclusión
Disrupción NR2B-DAPK1	Tat-NR2B _{CT}	Ratón	MCAO	60 min tras la oclusión

Disrupción DAPK1-p53	Tat-p53DM	Ratón	MCAO	6 h tras la oclusión
Inhibición de JNK	D-JNK-1	Ratón	MCAO	6 o 12 h tras la oclusión
Inhibición de JNK	SP600125	Ratón	MCAO	0, 0.5 o 1 h tras la reperusión
Inhibición de JNK	Tat-jbd	Ratón	MCAO	30 min tras la reperusión
Inhibición de PTEN	bvp	Ratón	MCAO	24 h tras la oclusión
Reducción de la translocación nuclear de PTEN	Tat-K13	Rata	MCAO	2 o 6 h tras la oclusión
Inhibición atónoma CamKII	Tat-CN21	Ratón	MCAO	1 h tras la oclusión

MCAO: oclusión de la arteria cerebral media; IE: Ictus embólico; II: Ictus iatrogénico; HI: Hipóxia-isquemia

Estos datos experimentales sugieren que la investigación de las interacciones proteína-proteína en el complejo NMDAR-NR2B, constituye una estrategia prometedora en la búsqueda de terapias en la isquemia cerebral.

3. PROTEÍNAS DE UNIÓN ESPECÍFICA O PREFERENTE A NR2B, SIN INTERACCIÓN CON NR2A

Se han descrito hasta el momento dos proteínas de unión específica o preferente a NR2B, DAPK1 y GIPC. DAPK1 ha sido ampliamente descrita en la bibliografía mientras que para GIPC los estudios existentes son más reducidos.

3.1. DAPK1

DAPK1 es una *serin-threonin protein kinase* de 160 kDa y 1430 aa, regulada por CaM que interacciona con el extremo C-terminal de NR2B sin interaccionar con la subunidad NR2A. De las proteínas neuronales asociadas a NR2B, DAPK1 tiene especial interés porque estudios recientes han revelado que es la proteína más prevalente de las que son reclutadas a la cola citoplasmática de la subunidad NR2B de los NMDARs durante la isquemia cerebral (Tu et al., 2010; Bialik and Kimchi, 2014; Lai et al., 2014).

Se ha identificado cuatro quinasas con una homología significativa en sus dominios catalíticos y se han denominado como proteínas relacionadas con DAPK1. *DAPK1 related protein* (DRP-1) presenta una homología con DAPK1 del 80% en su dominio catalítico y también está regulada por CaM. Se expresa en el citoplasma y promueve muerte celular (Inbal et al., 2000; Shani et al., 2001; Cohen and Kimchi, 2001). Una segunda proteína, ZIPK (Dlk), presenta un 80% de homología únicamente en su dominio catalítico (Shohat et al., 2002; Velentza et al., 2002), no presenta dominio regulatorio CaM y se encuentra en el núcleo. También se han identificado dos proteínas DRAK1 y DRAK2 con un 50% de homología con el dominio catalítico de DAPK1 (Shohat et al., 2002; Velentza et al., 2002), sin dominio regulatorio CaM y se localizan en el núcleo (Cohen and Kimchi, 2001).

3.1.1. Localización

DAPK1 se expresa en casi todos los tejidos de ratón y rata adultos y es particularmente abundante en el cerebro. Durante el desarrollo embrionario se ha detectado mRNA de DAPK1 en el córtex cerebral, células cerebelares de Purkinje y en el hipocampo. Tras el nacimiento, el mRNA de DAPK1 está restringido al hipocampo y a nivel proteico DAPK1 se expresa en neuronas corticales, hipocámpales y de bulbo olfatorio (Yamamoto et al., 1999; Henshall et al., 2003). Se localiza en el citoesqueleto en asociación con el sistema de

microfilamentos y la muerte celular provocada por sobreexpresión de DAPK1 depende de su correcta localización en el citoesqueleto (Cohen and Kimchi, 2001).

3.1.2. Estructura

DAPK1 presenta una estructura multidominio que incluye un dominio catalítico contiguo a un dominio regulatorio de unión a CaM con varios dominios flanqueantes de asociación macromolecular (Van Eldik, 2002; Nair et al., 2013) (Figura 13).

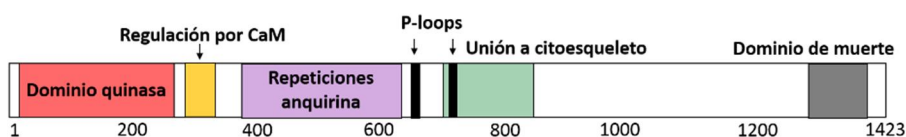


Figura 13. Representación de la estructura de DAPK1. Adaptada de Linda J. Van Eldick 2002 (Van Eldik, 2002).

El dominio catalítico (dominio quinasa) de DAPK1, formado por 11 subdominios, se encuentra en el extremo amino-terminal y precede al dominio de unión a CaM (Van Eldik, 2002; Nair et al., 2013). Constituye el dominio más importante debido a que la delección de este dominio provoca la pérdida de todas las funciones de DAPK1 examinadas hasta la fecha, incluyendo las proapoptóticas y la función supresora de tumores (Cohen and Kimchi, 2001).

El dominio de unión a CaM regula la activación y desactivación de DAPK1, que se encuentra regulada por un doble mecanismo de bloqueo; la fosforilación del residuo Ser-308 y la unión de CaM. La fosforilación de Ser-308 bloquea el sitio activo de DAPK1 inactivándola. Cuando se defosforila Ser-308, CaM puede unirse a su dominio de unión provocando un cambio conformacional de DAPK1 que desplaza el segmento de autoinhibición dejando accesible el sitio activo de DAPK1 (Shohat et al., 2001; Velentza et al., 2002; de Diego et al., 2010). El residuo Ser-308 se encuentra en medio del dominio de unión a CaM, este hecho

explica porque hay una disminución en la afinidad por CaM cuando está fosforilado y que la unión de CaM evite su fosforilación (de Diego et al., 2010). La delección de este dominio genera una quinasa activa de forma constitutiva con una mayor actividad catalítica independiente de Ca^{2+} (Cohen et al., 1999; Bialik and Kimchi, 2006).

La región de unión a citoesqueleto es esencial para la correcta función de DAPK1 (Cohen and Kimchi, 2001), las repeticiones de anquirina facilitan las comunicaciones proteína-proteína y en su mayoría están implicados en la degradación de DAPK1 (Nair et al., 2013). Contiene también dos sitios de unión a nucleótido (P-loops) involucrados en la unión a GTP. En el extremo C-terminal de DAPK1 se encuentra el dominio de muerte, asociado a interacciones proteína-proteína, actividad quinasa y funciones apoptóticas. La delección de este dominio reduce la capacidad de DAPK1 para inducir muerte celular por lo que constituye el segundo dominio más importante después del dominio catalítico (Cohen et al., 1999; Cohen and Kimchi, 2001; Van Eldik, 2002).

3.1.3. Funciones

Se han asociado a DAPK1 varios tipos de muerte programada que tienen lugar en función del tipo celular y de las señales específicas a las que está expuesto (Cohen et al., 1999; Inbal et al., 1997; Raveh and Kimchi, 2001; Pelled et al., 2002; Bialik et al., 2004). Se ha descrito a DAPK1 como mediador de la apoptosis inducida por interferón γ (Cohen et al., 1997), muerte celular mediada por TNFR (*tumor necrosis factor receptor*) (Cohen et al., 1999), autofagia inducida por estrés (Inbal et al., 2002; Zalckvar et al., 2009), degradación mediada por integrinas (Wang et al., 2002), fosforilación de miosina de cadena ligera y cambios citoplasmáticos asociados incluyendo la inducción de *membrane bebbing* con cambios citoplasmáticos durante la apoptosis (Kuo et al., 2003; Bialik et al., 2004). DAPK1 también actúa como supresor de tumores; suprime la transformación oncogénica *in vitro* y bloquea la metástasis *in vivo* (Inbal et al.,

1997; Raveh and Kimchi, 2001). En un número significativo de tumores, el gen de DAPK1 está anormalmente metilado y este silenciamiento correlaciona con recurrencia y metástasis (Inbal et al., 1997; Cohen and Kimchi, 2001; Michie et al., 2010). En el SNC, DAPK1 está involucrada en la muerte neuronal y su actividad incrementa en respuesta a la isquemia (Yamamoto et al., 1999; Schumacher et al., 2002b; Shamloo et al., 2005).

3.1.4. DAPK1 e isquemia cerebral

En el tejido cerebral normal DAPK1 se encuentra inactiva en su estado fosforilado. En respuesta a un estímulo que inicie procesos de muerte, como la exposición a MCAO o la privación de oxígeno y glucosa (OGD, *oxygen and glucose deprivation*), se produce una inmediata defosforilación y activación de DAPK1 que se mantiene durante toda la fase de reperfusión (MCAO y cultivos de neuronas sometidas a OGD) (Shohat et al., 2001; Shamloo et al., 2005). En condiciones patológicas como la isquemia, la entrada de Ca^{2+} a través de los canales NMDAR activa a calcineurina (CaN) que actúa como activador de DAPK1 induciendo la defosforilación del residuo Ser-308 y activando así DAPK1 (Tu et al., 2010; Nair et al., 2013). La isquemia también induce un incremento en la expresión de DAPK1, tal y como demuestra el incremento de mRNAs que codifican DAPK1 detectados en tejido dañado de modelos animales de isquemia cerebral (Yamamoto et al., 1999; Schumacher et al., 2002b; Shamloo et al., 2005).

Tras su activación, DAPK1 se une a los residuos 1292-1304 del dominio C-terminal de la subunidad NR2B de los NMDARs (Tu et al., 2010). Esta interacción NR2B-DAPK1 conduce a la fosforilación de NR2B en el residuo Ser-1303 potenciando la conductividad del canal, incrementando el flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la neurona y promoviendo de este modo la excitotoxicidad (Shamloo et al., 2005). Esta interacción de DAPK1 con NMDARs es exclusiva de los receptores NR1/NR2B, que se encuentran predominantemente en las zonas extrasinápticas. No se ha

observado efecto de DAPK1 sobre la entrada de Ca^{2+} a través de receptores de NMDA sinápticos (Tovar and Westbrook, 1999; Tu et al., 2010).

Varios estudios han descrito mediante ensayos por *western blot* (WB) un efecto proteolítico sobre DAPK1 en respuesta a isquemia (Figura 14). Shamloo M. y cols. reportaron una disminución de la banda de 160 KDa y un incremento de la banda de 120 KDa tras oclusión de ACM por filamento intraluminal y después de someter cultivos de neuronas corticales a OGD (Shamloo et al., 2005). Araki T. y cols. observaron una disminución de la banda de 160 KDa acompañada de un incremento de la de 60 KDa en modelos de epilepsia (Araki et al., 2004). En el estudio de Lin Y y cols. también observan proteólisis de DAPK1 con la aparición de una banda de 100 KDa (Lin et al., 2007).

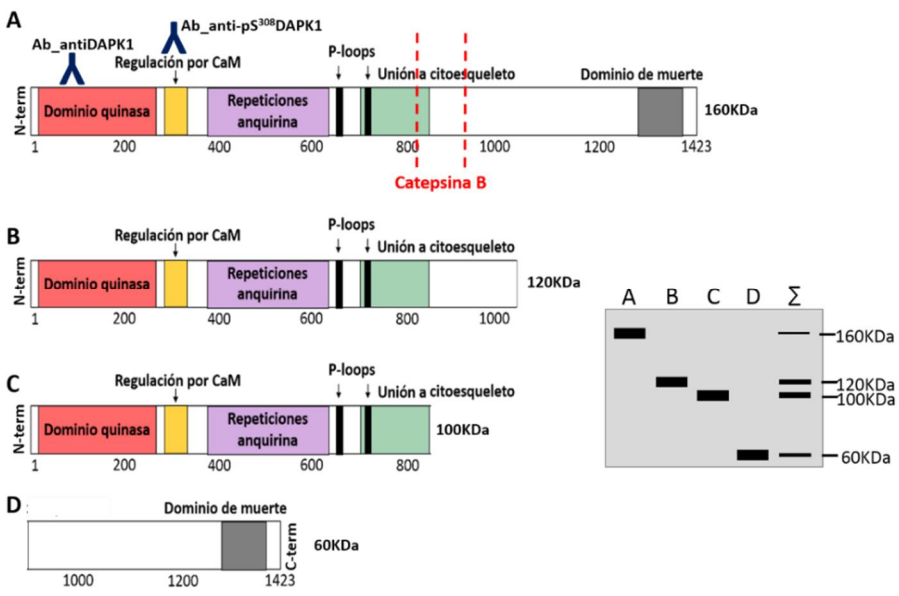


Figura 14. Proteólisis de DAPK1. A) Esquema de la estructura de DAPK1 (160KDa), de la zona de corte por catepsina B (aa 836-947) y del lugar de unión de los anticuerpos anti-DAPK1 y anti-pSer³⁰⁸DAPK1 utilizados en el estudio experimental de esta tesis. Representación de las formas de DAPK1 de 120 KDa (B), 100 KDa (C) y 60 KDa (D) descritas como resultado de la proteólisis de DAPK1. Adaptada de Linda J. Van Eldick 2002 (Van Eldik, 2002). Derecha: Modelo de las bandas correspondientes a DAPK1 intacta o DAPK1 proteolizada en un modelo de WB. En un análisis de las bandas de DAPK1 por WB se observaría una banda de 160 KDa para DAPK1 intacta (A) y, en función del punto de corte de catepsina podemos observar bandas de 120 KDa (B), 100 KDa (C), 60 KDa (D) o una mezcla de diferentes bandas correspondientes a DAPK1(Σ).

Respecto al efecto de la isquemia cerebral sobre la expresión total de DAPK1, Henshall DC y cols. observaron en modelos de epilepsia un incremento en el número de células que expresaban DAPK1 (Henshall et al., 2003) y un incremento de la expresión de DAPK1 en hipocampo de pacientes de epilepsia (Henshall et al., 2004). Por otro lado, Weihong Tu y cols. determinaron en cultivos de neuronas corticales sometidas a OGD un incremento de la actividad enzimática de DAPK1 a los 5 minutos tras la OGD con un pico máximo a los 30 minutos (Tu et al., 2010).

Ayudando el papel de DAPK1 en el daño cerebral producido por la isquemia, se ha determinado que la delección del gen que codifica DAPK1 es neuroprotector en cultivos de neuronas corticales frente a la exposición a NMDA u OGD (Tu et al.,

2010). Además, la administración de una pequeña molécula inhibidora de DAPK1 (*alkylated 3-amino-6-phenylpyridazine*) es neuroprotectora en un modelo de daño cerebral inducido por hipoxia (Velentza et al., 2003). Esta molécula también es neuroprotectora en modelos de isquemia *in vitro* (neuronas corticales sometidas a OGD) e *in vivo* (MCAO) (Shamloo et al., 2005). Aún con estos resultados tan prometedores los autores del trabajo indican que esta molécula no presenta las características moleculares que lo conviertan en un candidato para el desarrollo de fármacos pero lo consideran un buen punto de partida (Velentza et al., 2003). Es importante destacar que impedir la interacción DAPK1-NR2B protege frente a la muerte neuronal excitotóxica tras la isquemia *in vitro* e *in vivo*, sin afectar la actividad fisiológica del canal NMDA u otras proteínas de señalización que actúan por debajo de estos receptores (Tu et al., 2010).

Con estos antecedentes se ha postulado a DAPK1 como amplificador de la señalización de los NMDARs extrasinápticos en la muerte neuronal isquémica y, por ello, la actuación sobre la interacción DAPK1-NR2B podría considerarse una estrategia prometedora como terapia en la isquemia cerebral.

3.1.5. Moléculas que interaccionan con DAPK1

Entre los reguladores directos de la actividad catalítica de DAPK1 se han descrito:

Calmodulin (CaM): DAPK1 tiene un dominio de regulación por CaM, inmediatamente posterior al dominio catalítico y la unión de CaM provoca un cambio conformacional de DAPK1 dejando accesible el sitio activo de DAPK1 (Shohat et al., 2001; Velentza et al., 2002; de Diego et al., 2010).

Protein phosphatase 2A (PP2A): *In vitro* e *in vivo*, la activación de PP2A debido a estrés del retículo endoplasmático o durante el proceso de *anoikis* inducido por ceramida conduce a la unión de PP2A a DAPK1 y la consiguiente defosforilación y activación de DAPK1 (Gozuacik et al., 2008; Widau et al., 2010).

Calcineurin: En la isquemia cerebral, la entrada de Ca^{2+} a través de los canales NMDAR activa a calcineurina (CaN) que defosforila el residuo Ser-308 de DAPK1, activándola (Tu et al., 2010; Nair et al., 2013).

Netrin receptor (UNC5H2): Netrina es una proteína que juega un importante papel durante el desarrollo del sistema nervioso mediando la quimioatracción/quimiorepulsión de los axones/neuronas mediante la interacción con sus receptores. En ausencia de netrina-1, los receptores UNC5H2 se unen al dominio de muerte de DAPK1 y defosforilan el residuo Ser-308, incrementando la actividad catalítica de DAPK1 y la apoptosis dependiente de DAPK1 (Llambi et al., 2005).

Otros reguladores adicionales de DAPK1 son:

Extracellular-signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2): ERK interacciona con el dominio de muerte de DAPK1 y fosforila el residuo Ser-735, incrementando la actividad catalítica de DAPK1 hacia miosina de cadena ligera (MLC, *myosin light chain*) tanto *in vitro* como *in vivo*. Por otro lado, DAPK1 promueve la retención de ERK en el citoplasma inhibiendo la activación de la proteína quinasa ribosomal S6 (RSK) en el núcleo y la expresión de CREB, promoviendo así la actividad proapoptótica de DAPK1 (Chen et al., 2005; Pei et al., 2014).

Ribosomal protein kinase S6 (RSK): RSK interacciona con DAPK1 y la fosforila en el residuo Ser-289 atenuando su actividad proapoptótica (Anjum et al., 2005).

Phospho-p-38 mitogen-activated protein kinase (p-p38 MAPK): p-p38 MAPK interacciona con DAPK1 durante la apoptosis inducida por TNF (*tumor necrosis factor*) en células de cáncer colorectal incrementando su actividad catalítica (Bajbouj et al., 2009).

The leukocyte antigen-related protein tyrosine phosphatase (LAR) y protein tyrosine kinase Src (Src): LAR se une a las repeticiones de anquirina de DAPK1 y defosforila los residuos Tyr-491/492 activándola e incrementando la fosforilación de su sustrato MLC *in vitro* e *in vivo* y potenciando sus efectos proapoptóticos.

Por otro lado, la inhibición de LAR o la fosforilación de estos residuos por Src presentan el efecto contrario sobre la actividad de DAPK1 (Wang et al., 2007).

DANGER: DANGER, es una proteína descubierta recientemente que interacciona con DAPK1 e inhibe su actividad catalítica. Neuronas hipocampales que no expresan DANGER presentan ratios de muerte incrementados, ratones knockout para DANGER muestran una muerte neuronal incrementada tras la inyección de NMDA y mayor daño isquémico tras MCAO (Kang et al., 2010).

Entre los reguladores de la estabilidad de DAPK1:

El complejo *Heat shock protein 90 / E3-ubiquitin-protein ligase CHIP / DAPK-interacting Protein 1, DIP-1* o *E3 Ubiquitin-protein Ligase MIB1 (HSP90/CHIP/DIP-1(MIB-1))*: HSP90 promueve la estabilización y actividad de DAPK1. Cuando se inhibe HSP90 se induce una degradación preferente de DAPK1 defosforilada mediante la ubiquitin-ligasa CHIP formando el complejo HSP90-DAPK1-CHIP o mediante la ubiquitin ligasa Mindbomb 1 (MIB1)/DAPK interacting protein-1 (DIP-1), que se une a las repeticiones de anquirina de DAPK1. Estas interacciones provocan la acumulación de DAPK1 fosforilada e inactiva (Jin et al., 2002; Henshall et al., 2004; Citri et al., 2006; Zhang et al., 2007a).

***Cullin 3 substrate-adaptator (KLHL20)*:** KLHL20 se une al dominio de muerte de DAPK1 y la recluta al complejo Cul3-ROC1 para su ubiquitinación y posterior degradación por proteasoma, atenuando de este modo su función proapoptótica (Lee et al., 2010).

Se han descrito los siguientes sustratos de DAPK1:

***Myosin light chain (MLC)* y *Tropomyosin-1*:** Estas interacciones contribuyen a los efectos de DAPK1 sobre el citoesqueleto, incluyendo *membrane bebbing* (Cohen

et al., 1997; Inbal et al., 2000; Shohat et al., 2002; Velentza et al., 2002; Kuo et al., 2003; Houle et al., 2007).

Actin: La muerte celular provocada por sobreexpresión de DAPK1 depende de su correcta localización en el citoesqueleto (Cohen and Kimchi, 2001; Bialik and Kimchi, 2004; Harrison et al., 2008; Wu et al., 2011).

Beclin-1 y Protein kinase D (PKD): Ambas sustratos de DAPK1 median los efectos de DAPK1 en autofagia. Ambas proteínas interactúan y son fosforiladas por DAPK1 conduciendo a su activación. En SH-SY5Y, la administración de piruvato provoca la disociación de DAPK1-NR2B y la asociación con Beclin-1, reduciendo la entrada de Ca^{2+} a través de NR2B y protegiendo a la mitocondria de la excitotoxicidad por glutamato. La fosforilación de PDK provoca muerte necrótica (Eisenberg-Lerner and Kimchi, 2007; Zalckvar et al., 2009; Tian et al., 2014).

Tumor protein p53 (p53): DAPK1 interactúa con p53 en el citoplasma y la fosforila en el residuo Ser-23, activando la apoptosis dependiente de p53 (Araki et al., 2004; Pei et al., 2014)).

Subunidad NR2B de los NMDARs: DAPK1 actúa como amplificador de señal de los NMDARs extrasinápticos mediando daño celular en la isquemia cerebral. Durante la isquemia, DAPK1 se une a NR2B y lo fosforila en el residuo Ser-1303 exacerbando la entrada masiva de Ca^{2+} a través del canal de NMDAR e induciendo muerte neuronal (Tu et al., 2010)

Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2): La fosforilación por DAPK1 inhibe la actividad de CaMKK2. Aunque no se conoce la consecuencia de esta inhibición, se ha sugerido que podría inducir muerte neuronal debido a la pérdida de más de una vía de supervivencia (Schumacher et al., 2004).

Zipper interacting protein kinase (ZIPK (DIK)): Tanto *in vivo* como *in vitro*, DAPK1 interactúa con ZIPK (se desconoce si de forma directa o indirecta) y la fosforila de forma múltiple a lo largo de su dominio extracatalítico. Esta interacción podría

amplificar los efectos celulares de la cascada de DAPK1 (Shani et al., 2004; Mukhopadhyay et al., 2008).

40S Ribosomal protein S6: La fosforilación de la proteína ribosomal S6 por DAPK1 inhibe la síntesis proteica, aunque todavía no se conoce el mecanismo implicado (Schumacher et al., 2006; Stevens et al., 2009).

phospho-Ser/Thr directed peptidyl-prolyl isomerase (Pin1): DAPK1 fosforila Pin1 inhibiendo su actividad catalítica y promoviendo así neurodegeneración (Lee et al., 2011).

Otros sustratos de DAPK1 de los que todavía no se ha determinado las consecuencias funcionales son:

Syntaxin-1A y Minichromosome Maintenance Complex Component 3 (MCM3): DAPK1 interacciona y fosforila a syntaxin-1A (de forma dependiente de Ca^{2+}) y a MCM3 *in vivo* e *in vitro* pero no se conoce el efecto de esta interacción (Tian et al., 2003, Bialik et al., 2008, Bialik and Kimchi, 2014).

DAPK1 también presenta funciones independientes de su actividad catalítica y puede regular proteínas efectoras solamente mediante interacción:

Microtubule-affinity-regulating-kinase (MARK) protein 1/2 (MARK1/2): El dominio de muerte de DAPK interacciona con MARK1 y MARK2 liberándolas del mecanismo de autoinhibición y activándolas mediante un cambio conformacional. DAPK1 provoca el desensamblaje de MARK1/2 de los microtúbulos inhibiendo la formación axónica (Wu et al., 2011).

Microtubule-associated protein 1B (MAP1B): El dominio de muerte de DAPK1 interacciona con MAP1B mediante su dominio N-terminal provocando reducción

de la viabilidad celular, inducción de autofagia y generación de *bebbling* de membrana (Harrison et al., 2008).

Protein 14-3-3: DAPK1 Interacciona con la proteína 14-3-3 (inhibe ASK1, quinasa promotora de apoptosis mediante TNFR1) en las zonas de hipocampo que han sobrevivido a un ataque epiléptico (Henshall et al., 2003).

Cathepsin B: Interacción localizada en el dominio C-terminal de DAPK1, entre las repeticiones de anquirina y el dominio de muerte. TNFR-1 induce la interacción de DAPK1-catepsina B generando un complejo multi-proteína de supervivencia que contrarresta el índice de apoptosis dependiente de TNFR. Por otro lado, Cathepsin B también reduce los niveles proteicos de DAPK1 (Lin et al., 2007).

Pyruvate kinase M2 (PKM2): En células cancerosas el dominio de muerte de DAPK1 interacciona con PKM2 activándola y estabilizándolas, contribuyendo a crecimiento tumoral y producción de estrés oxidativo (Mor et al., 2012; Erol, 2012).

Inflamosome NLRP3: DAPK1 es necesaria para el ensamblaje del inflamosoma y activación de caspasa 1 y producción de IL-1 β (Chuang et al., 2011).

STAT3: TNF induce la interacción entre DAPK1 y STAT3 en células intestinales induciendo un cambio conformacional de STAT3 que enmascara su señal de localización nuclear en respuesta a TNF (Chakilam et al., 2013).

Todos estos sustratos de DAPK1 indican que el interactoma de DAPK1 es amplio y multifuncional. Además, tienen que existir otros sustratos que todavía no se han identificado y que expliquen diferentes funciones de DAPK1 que todavía no han sido atribuidas a un sustrato específico. La búsqueda en bases de datos del motivo de unión a sustrato óptimo propuesto para DAPK1 indica que existen 200 proteínas que lo contienen y podrían ser sustratos potenciales (Bialik and Kimchi, 2014).

3.2. GIPC

La familia GIPC está formada por GIPC/GIPC1, GIPC2 y GIPC3. GIPC y GIPC2 presentan una homología del 62% y GIPC-GIPC3 del 59.9%. Están formadas por un dominio central PDZ y dos dominios de homología GH1 y GH2 que están conservados entre los miembros de la familia (Katoh, 2002).

GIPC (*GAIP/RSG19-interacting protein*), fue identificado por su capacidad de unirse al extremo C-terminal de RSG19/GAIP mediante su motivo PDZ (De Vries et al., 1998). Sin embargo, desde entonces se ha observado que los ligandos de GIPC no se definen por un dominio PDZ común sino que se asocia a proteínas con distintos dominios PDZ. La mayoría de los ligandos de GIPC son proteínas transmembrana (entre ellas el receptor de dopamina D2, el transportador de glucosa GLUT1, IGFR1, receptores de tirosin quinasa (RTKs), integrinas) aunque una minoría corresponden a reguladores de señalización citosólicos (como APPL1 o RGS19) (Katoh, 2013).

La expresión diferencial de GIPC se ha determinado en diferentes tejidos. Así, en orden descendente de abundancia: páncreas > músculo esquelético > cerebro, riñón, placenta > pulmón, estómago >> corazón (De Vries et al., 1998). GIPC es una proteína ubicua (De Vries et al., 1998) y se ha descrito un número creciente de proteínas que interactúan con implicaciones funcionales como la organización y regulación de cascadas de señalización (Lou et al., 2001), anclaje de proteínas a compartimentos subcelulares específicos (Wang et al., 1999) y a la membrana plasmática (Hirakawa et al., 2003; Jeanneteau et al., 2004).

La región N-terminal está involucrada en dimerización y el dominio C-terminal interactúa con la proteína miosina VI (MYO6), proteína involucrada en el tráfico de endosomas primarios y migración (Naccache et al., 2006). El complejo GIPC-MYO6 tiene un papel esencial en el transporte de proteínas transmembrana en vesículas endocíticas. La mayoría de receptores transmembrana en endosomas primarios son devueltos a la membrana plasmática directamente vía endosomas

de reciclaje, aunque algunos son clasificados para degradación lisosomal (Katoh, 2013).

GIPC está sobreexpresado en cáncer de mama, de ovarios y de páncreas y su inhibición impide la proliferación y promueve apoptosis (Katoh, 2013). En neuronas hipocámpales GIPC se expresa en toda la célula, incluyendo ambos terminales pre- y postsinápticos (Jeanneteau et al., 2004; Yano et al., 2006). Se ha determinado que GIPC es esencial para la liberación de neurotransmisores dependiente de BDNF y su receptor TrkB (Yano et al., 2006). En neuronas hipocámpales se ha demostrado que GIPC interacciona con los NMDARs mediante su dominio PDZ. GIPC se une preferentemente a la subunidad NR2B de los NMDARs tanto en la membrana como en el citoplasma y los cambios en la expresión de GIPC afectan al número de receptores presentes en la superficie celular. Se ha sugerido que GIPC estabilizaría a los receptores extrasinápticos en la membrana, de este modo, la disrupción de esta interacción se contempla como requisito para la internalización del receptor y, una vez en endosomas, GIPC se volvería a unir al receptor durante el reciclaje y exocitosis (Yi et al., 2007).

La inhibición selectiva de las interacciones proteína-proteína del dominio PDZ, con la consecuente disrupción de vías de señalización asociadas a la actividad de GIPC, se contempla como una estrategia prometedora para desarrollar nuevas terapias (Patra et al., 2012).

4. ESTATINAS Y SEÑALIZACIÓN DE pCREB

Los inhibidores de HMG-CoA (Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A reductase) o estatinas, actúan en el metabolismo lipídico inhibiendo la acción de la HMG-CoA reductasa (Istvan, 2002; Jones, 2003). La enzima HMG-CoA reductasa cataliza el paso clave en la biosíntesis de colesterol; la conversión de HMG-CoA a ácido mevalónico, precursor del colesterol (Reinoso et al., 2002). De este modo las estatinas reducen los niveles de colesterol LDL (*low density lipoprotein*) (Istvan,

2002; Jones, 2003), comportando una reducción en el riesgo de evento vascular (Rodríguez-Yanez et al., 2008).

La estatinas, además de sus efectos en el perfil lipídico, también ejercen efectos pleiotrópicos vasculares beneficiosos de forma independiente de sus propiedades reductoras de colesterol (Laufs and Liao, 2003; Wang et al., 2008; Endres 2005). Otros efectos pleiotrópicos de las estatinas son atenuación del estrés oxidativo y de la inflamación, reducción de la presencia de NMDARs en rafts lipídicos (Ponce et al., 2008), facilitación los procesos de angiogénesis, neurogénesis y sinaptogénesis (Chen et al., 2003; Zhang et al., 2005) y activación de vías de supervivencia como Akt, Ras-ERK y Wnt (Chen et al., 2003; van der Most et al., 2009; Cespedes-Rubio et al., 2010).

Estudios *in vitro* han demostrado eficacia del pretratamiento crónico (>3 días) con estatinas en la neuroprotección frente a la exposición de NMDA (Zacco et al., 2003) y a glutamato (Endres, 2005) (Bosel et al., 2005). En modelos animales de ictus se ha descrito que el pretratamiento con estatinas reduce el volumen de infarto y/o el daño isquémico respecto a los animales no tratados (Endres et al., 1998; Laufs and Liao, 2000; Balduini et al., 2001). En 2003 se describió que la administración de atorvastatina/simvastatina después de la oclusión también reducía el volumen de infarto cerebral tanto a las 24 como a las 48 horas (Sironi et al., 2003). Estudios posteriores observaron efectos similares cuando realizaron tratamientos con simvastatina (Nagaraja et al., 2006), atorvastatina (Zhang et al., 2005; Hong et al., 2006), pravastatina (Sugiura et al., 2007) o rosuvastatina (Prinz et al., 2008).

Varios estudios han determinado que el tratamiento con estatinas incrementa la señalización de CREB o la actividad de las proteínas quinasas que lo regulan (Bell and Yellon, 2003; Prinz et al., 2008; Prakash et al., 2011). En este sentido, se ha demostrado que administración de simvastatina previa a la isquemia incrementa la expresión de pCREB en cerebros de rata (Carlioni et al., 2009) y que la

administración crónica de lovastatina en ratas isquémicas promueve la activación de CREB (Huo et al., 2014).

A través de su efecto sobre el factor de supervivencia CREB, las estatinas podrían tener también un efecto directo en la protección de las neuronas durante la isquemia. Se ha determinado que el pretratamiento con ATV protege a las neuronas corticales en cultivo de la excitotoxicidad inducida por exposición a glutamato (Bosel et al., 2005) e incrementa los mecanismos de supervivencia neuronal mediante la activación de Akt (Cespedes-Rubio et al., 2010). Un estudio reciente ha demostrado que la administración de ATV en la fase aguda postisquemia restablece los niveles de BDNF en el córtex e hipocampo en modelos animales de isquemia cerebral. El tratamiento con ATV conduce a la recuperación del citoesqueleto de actina permitiendo el transporte de los receptores y su estabilidad en la sinapsis. Además ATV recupera la asociación entre NR2B y el receptor de tirosina kinasa (TrkB), sobre el que BDNF actúa para activar la cascada Ras-ERK (Gutierrez-Vargas et al., 2014).

En la mayoría de trabajos en modelos animales de ictus se administran las estatinas a unas dosis ≥ 5 mg/Kg (García-Bonilla et al., 2012), dosis 5 veces más elevadas que las administradas en humanos. Así, la atorvastatina se administra en animales a $\geq 5-20$ mg/Kg mientras que en humanos la dosis máxima es de 80 mg/día, que en pacientes de ~ 70 Kg corresponden a 1,2 mg/Kg.

Atorvastatina (ATV), una de las estatinas más utilizadas en la práctica clínica, es bien tolerada en humanos y no presenta efectos adversos (Cilla et al., 1996). Tras su administración, ATV es rápidamente metabolizada en el hígado, principalmente por CYP3A, generando dos metabolitos activos, ortho-hydroxy atorvastatin (o-ATV) y para-hydroxy atorvastatin (p-ATV) (Black et al., 1999; Jacobsen et al., 2000; Lennernas, 2003; Lins et al., 2003; Lau et al., 2006). El metabolito principal es o-ATV, cuya concentración en plasma de pacientes es diez veces mayor que la de p-ATV (Borek-Dohalsky et al., 2006). ATV es detectable en plasma a concentración nanomolar hasta las 12 horas de su administración, aunque sus metabolitos

activos se detectan a niveles nM mucho antes (Lins et al., 2003; Lau et al., 2006). Se ha estimado que el 70% de ATV se encuentra en forma de metabolitos, que son activos inhibidores de HMG-CoA reductasa (Lea and McTavish, 1997; Kantola et al., 1998).

No se ha determinado el posible efecto de las estatinas, a las concentraciones presentes en sangre en los pacientes y por tanto relevantes en clínica, sobre las señales de supervivencia como pCREB ni su potencial real como moléculas protectoras por efecto directo en las neuronas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base al conocimiento previo del papel antagónico de los receptores de NMDA sinápticos y los receptores de NMDA extrasinápticos en la supervivencia neuronal, la presente tesis estudió la intervención sobre la señalización de los NMDARs sinápticos (Parte 1) o la identificación de nuevos efectores de los NMDARs extrasinápticos (Parte 2) como estrategias para proteger del daño neuronal en el ictus isquémico.

5.1. PARTE 1: Intervención sobre los NMDARs sinápticos

HIPÓTESIS: La activación selectiva de los receptores de NMDA sinápticos al inicio de la perfusión incrementa la fosforilación del factor de supervivencia CREB e induce neuroprotección en cultivos primarios de neuronas corticales.

Objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto de la activación selectiva de receptores de NMDA sinápticos sobre la fosforilación de CREB tras la privación de oxígeno y glucosa + perfusión *in vitro* (OGD/R) y sobre neuroprotección
2. Establecer, dentro de los fármacos disponibles en el mercado, un posible tratamiento farmacológico que actúe sobre CREB y sea capaz de proteger a neuronas previamente expuestas a OGD/R.

5.2. PARTE 2: Intervención sobre los NMDARs extrasinápticos

HIPÓTESIS: El cambio en el interactoma de los receptores de NMDA extrasinápticos tras la OGD/R permite la identificación de proteínas candidatas a ser dianas de intervención para proteger a las neuronas de la muerte excitotóxica inducida por OGD/R.

Objetivos específicos:

1. Obtención de los complejos de proteínas asociadas específicamente a los receptores de NMDA extrasinápticos.
2. Análisis de los complejos de proteínas asociadas a receptores de NMDA extrasinápticos para identificar posibles candidatos a proteger neuronas en riesgo de muerte excitotóxica.

METODOLOGÍA

6. METODOLOGÍA COMÚN PARA LAS PARTES 1 Y 2

6.1. Cultivo primario de neuronas corticales

Se realizaron cultivos primarios de neuronas corticales de rata a partir de fetos de 18 días de la cepa Sprague-Dawley. Los procedimientos en la manipulación y sacrificio de los animales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Fundación IGTP y están en conformidad con las directrices institucionales nacionales (Artículo 32 del Decreto 214/1997, DOGC 2450) e internacionales (Guide for the care and use of Laboratory Animal, National Institutes of Health, 1985).

Se utilizaron placas de cultivo de 24 pocillos (1,9 cm²/pocillo), placas de cultivo de 56,7 cm² (petri) o sistemas de cámara de cultivo sobre portaobjetos (1,7 cm²/pocillo), según los procedimientos a realizar posteriormente, y que se detallan en los apartados metodológicos específicos. En todos los casos, excepto en los ensayos de obtención de muestra de membrana (apartado 8.2), los soportes para cultivo fueron tratados con *poly-L-lysine* (Sigma) durante 24 h a 37°C para facilitar la adhesión de las células neuronales. Antes de sembrar las células, se lavaron las placas 5 veces con agua estéril. La concentración de *poly-L-lysine* utilizada fue 20 µg/ml, 100 µg/ml o 250 µg/ml según los ensayos a realizar posteriormente y que se detallan en cada apartado metodológico específico.

Cada cultivo se realizó a partir de 15-25 cerebros de fetos obtenidos de dos ratas gestantes. Para obtener las células a partir del tejido se utilizaron las siguientes soluciones:

- *Solución 1*: Tampón KREBS (1.2 M NaCl, 48 mM KCl, 13 mM KH₂PO₄, 250 mM NaHCO₃ y 140 mM glucosa), 3 mg/mL albúmina sérica bovina (BSA), 30,4 mg/mL MgSO₄, pH 7,4. (Volumen total de 100 mL)
- *Solución 2*: 25 mL de solución 1 suplementada con 80 µg/mL de Tripsina.
- *Solución 3*: 20 mL de solución 1 suplementada con 1 µg/mL DNAsa I, 25 µg/mL inhibidor de tripsina y 30,4 mg/mL MgSO₄.

- *Solución 4*: 10 mL de solución 1 suplementada con 30,4 mg/mL MgSO₄, 14,4 mg/mL CaCl₂ y 40 mg/mL BSA.

Tanto las soluciones como el medio de cultivo se prepararon el mismo día que se realizó el cultivo y se filtraron en condiciones estériles con filtros de acetato de celulosa de 0,22 µm de tamaño de poro.

Las hembras gestantes se sacrificaron por decapitación en condiciones asépticas y se extrajeron los fetos y placenta. A partir de este momento, la preparación del cultivo se realizó en campana de cultivos en condiciones estériles. Los cerebros de los fetos se mantuvieron en solución 1 para evitar un choque osmótico y la posibilidad de que se secaran. Se diseccionaron los lóbulos fronto-temporales que, una vez limpios de meninges, fueron disgregados mecánicamente utilizando dos bisturís. Se recogieron en 25 mL de solución 1 y se centrifugaron a 200xg durante 5 min, descartando el sobrenadante resultante. Para tripsinizar el tejido se añadió la solución 2 (contiene tripsina) y se mantuvo 10 min a 37°C con agitación suave. Seguidamente se añadió la solución 3 para inhibir la acción de la tripsina y se centrifugó a 200xg durante 5 min. Se descartó el sobrenadante, se añadió la solución 4 para limpiar el pellet y se realizó una disgregación mecánica suave, pipeteando repetidas veces con la pipeta de 200 µl y la de 1000 µl. Se centrifugó a 200xg durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 4mL de medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado fue Neurobasal (Gibco) suplementado con 2% B-27 (Gibco), 0,5 µM L-glutamina y 40 µg/mL gentamicina. La suspensión celular se pasó por una malla de Nylon de 40 µm para obtener una suspensión celular homogénea libre de restos de tejido.

La concentración de la suspensión celular se calculó mediante contaje celular en una cámara de Newbauer. Cinco µL de suspensión celular se diluyeron en 50 µL del colorante para distinguir las células vivas (excluyen el azul de tripano) de las células muertas (teñidas) y así realizar el contaje de las células vivas.

Las neuronas corticales se sembraron a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células/cm² en las placas de cultivo previamente tratadas con poly-L-Lysina en el medio de

cultivo mencionado anteriormente y se mantuvieron en un incubador (Galaxy RX (RS Biotech)) a 37°C y en una atmósfera del 95% de aire con un 5% de CO₂.

Se cambió un tercio y un cuarto de medio de cultivo (condicionado) por medio fresco a los 4 y 7 días *in vitro* (DIV, *days in vitro*), respectivamente. Los experimentos se realizaron a los 11-12DIV.

Cada cultivo a partir de 20-25 fetos permite sembrar neuronas corticales en unas 12 placas de 24 pocillos o unas 20 placas de petri de 56,7cm².

6.2. Privación de Oxígeno y Glucosa *in vitro* + Reperusión (OGD/R)

En estudios preclínicos *in vitro*, la retirada de glucosa combinada con privación de oxígeno (OGD) se ha utilizado de forma frecuente como modelo de isquemia (Goldberg and Choi, 1993). La excitotoxicidad por glutamato (Choi, 1988), la elevación patológica de los niveles intracelulares de calcio (Ca²⁺) y sodio (Na⁺) (Kristian and Siesjo, 1998) y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Starkov et al., 2004, Moro et al., 2005) son componentes importantes de la cascada excitotóxica producida por la OGD/R. Para realizar los estudios de OGD/R comprendidos en esta tesis, se utilizaron cultivos maduros de neuronas corticales de 11-12 DIV y se aplicaron algunas modificaciones de protocolos publicados anteriormente (Aarts et al., 2003; Serra-Perez et al., 2008).

Los medios de tratamiento se prepararon frescos el mismo día que se realizó el experimento y se filtraron en condiciones estériles con filtros de acetato de celulosa de 0,22 µm de tamaño de poro. Los medios de tratamiento utilizados fueron los siguientes:

- Medio Control: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco) suplementado con 25 mM glucosa, que corresponde a la concentración de glucosa del medio de cultivo condicionado.

- Medio OGD: DMEM (sin glucosa, para reproducir una situación de hipoglucemia)

Se retiró el medio de cultivo en el que habían madurado las neuronas (medio condicionado) y se guardó en placas gemelas. Se hizo un lavado de los cultivos con el medio de tratamiento correspondiente (Control u OGD) y se mantuvieron en el medio de tratamiento durante el tiempo de OGD. Las placas con cultivos destinados al tratamiento OGD se sometieron a 90 min de hipoxia por exposición a una atmósfera pobre en oxígeno (2% O₂) en un incubador de hipoxia Galaxy R+ (RS Biotech). Este incubador permite establecer en su interior una atmósfera con un porcentaje de O₂ inferior al ambiental mediante la adición de N₂ (que desplaza el O₂). En paralelo, en las neuronas control se reemplazó el medio condicionado por medio control y se mantuvieron en un incubador Galaxy R+ en condiciones de normoxia (20% O₂) durante 90 min. Una vez transcurridos los 90 min, se retiró el medio DMEM y se devolvió el medio condicionado a cada pocillo. En este punto se daba por finalizada la OGD y empezaba la fase de reoxigenación y retorno de glucosa, correspondiente a la fase de reperfusión *in vivo* (Figura 15). A lo largo de esta tesis doctoral nos referiremos a este procedimiento como OGD/R y a la fase de reperfusión como “fase R”.

Para la caracterización del componente glutamatérgico-excitotóxico de este modelo se trataron los cultivos de neuronas corticales de 12 DIV con 40 μM CNQX (antagonista de AMPARs y kainato) o 10 μM MK801 (antagonista de NMDARs) al inicio de la fase R y se determinó la muerte neuronal a las 24 h de R mediante el procedimiento que se describe a continuación.

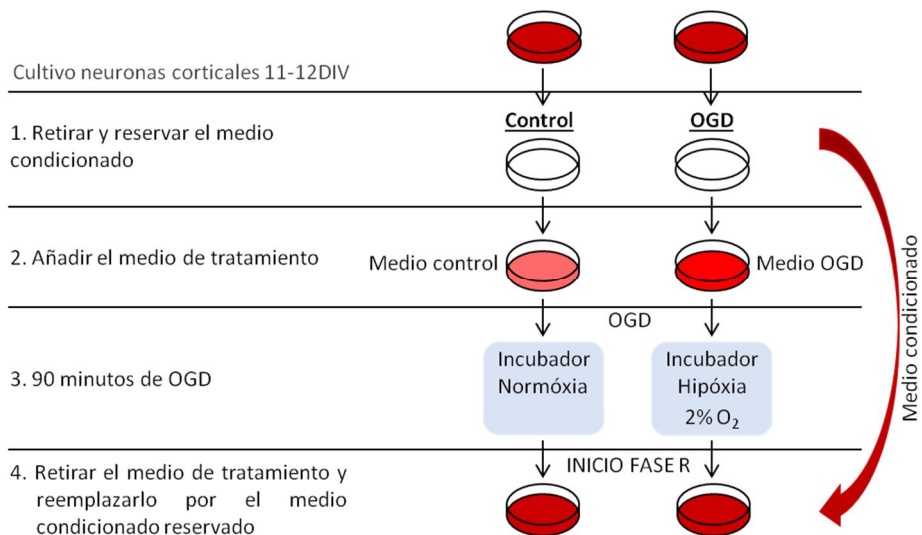


Figura 15. Esquema explicativo del protocolo de OGD/R utilizado como modelo de isquemia *in vitro*.

6.3. Determinación de la muerte neuronal

Para determinar la muerte neuronal utilizamos *propidium iodide* (PI). El PI es un compuesto que se introduce en las células que tienen la membrana dañada y que, al unirse al DNA, emite fluorescencia. Este compuesto es excluido por la membrana plasmática intacta de las células viables por lo que permite diferenciar células viables y células muertas en una misma preparación ya que sólo las células muertas emiten fluorescencia. Éste método constituye una medida de la pérdida de viabilidad celular similar a la obtenida mediante la cuantificación de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) y a la cuantificada mediante ensayos con azul de tripano (Rudolph et al., 1997). La equivalencia PI/LDH en la cuantificación de muerte neuronal se había comprobado previamente también en nuestro laboratorio.

El procedimiento se basó en el protocolo de Rudolf y cols.. Se añadió 30µM de PI (Sigma-Aldrich) al medio condicionado de las neuronas en cultivo. Pasados 15

min, se midió la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 560nm y de emisión a 645nm directamente en las placas de cultivo con el lector Varioskan Flash (Thermo Electron Corporation). Esta medición, tomada antes de realizar el tratamiento de estudio, se denomina F_{-1} . Las posteriores mediciones se realizaron a distintos tiempos después del tratamiento (F_n). La última lectura se realizó a las 24 h de la fase R y, posteriormente, se añadió al medio condicionado 375 μ M de digitonina (Sigma-Aldrich) para obtener el valor de muerte máxima (F_{max}). Para determinar el porcentaje de muerte se utilizó, para cada pocillo, la fórmula siguiente:

$$\% \text{ muerteneuronal} = \left[\frac{(F_n - F_{-1})}{(F_{max} - F_{-1})} \right] \times 100$$

Donde:

F_{-1} es el valor de fluorescencia basal en cada pocillo previo al tratamiento

F_n el valor de fluorescencia a cada tiempo tras el tratamiento

F_{max} el valor máximo de fluorescencia de cada pocillo (100% muerte neuronal)

6.4. Extracción y determinación de la concentración de proteínas

6.4.1. Extracción de proteínas

Todo el proceso de extracción de proteínas se realizó sobre hielo. Se retiró el medio condicionado o medio condicionado + tratamientos de los cultivos de neuronas corticales y se realizaron dos lavados de los pocillos con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,6 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM) o tampón TBS (Tris-Cl 20 mM, pH 7,6, 137 mM NaCl, 2,6 mM KCl). Seguidamente se añadió el tampón de extracción de proteína (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 10% Glicerol, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, pH8) y se raspó mecánicamente el fondo de la placa para obtener la máxima cantidad de proteína de las neuronas. Los homogenados obtenidos se pasaron a tubos de microcentrífuga, se sonicaron durante 3 min en

un sonicador de ultrasonidos y se pusieron en hielo durante 30 min. Seguidamente se centrifugaron a 4°C a 15000xg durante 20 min y se recuperaron los sobrenadantes en tubos de microcentrífuga nuevos. Se guardó un alícuota de 20 µL de cada homogenado para la posterior determinación de la concentración de proteína y al volumen restante se le añadió PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) hasta una concentración final de 1 mM e inhibidores de proteasas (protease inhibitor cocktail, Sigma). En los estudios en los que interesaba mantener intactos los estados de fosforilación se utilizó TBS en lugar de PBS para el lavado de los pocillos y se añadió al homogenado NaF y Na₃VO₄ hasta 1 mM en ambos casos. Las muestras se guardaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

6.4.2. Determinación de la concentración de proteína

Para determinar la concentración de proteína en cada una de las muestras se utilizó el *kit BCA protein assay* (Pierce). Este kit se basa en la reducción del ion cobre Cu²⁺ a Cu⁺, mediada por las proteínas (reacción de Biuret). El ion Cu⁺ es capaz de quelar el *bicinchoninic acid* (BCA) de manera que se forma un complejo de color púrpura soluble en agua. Este complejo da un pico de absorbancia máxima a 562 nm y su densidad óptica aumenta de forma lineal dentro de un rango de concentración de proteínas, lo que permite establecer una recta patrón e interpolar los valores de absorbancia de las muestras para conocer la concentración proteica.

6.5. Ensayos de Western Blot (WB)

Para detectar proteínas específicas presentes en la muestra se utilizó la técnica de Western Blot (WB). Esta técnica se basa en la separación mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes de las proteínas presentes en una muestra según el peso molecular, la posterior transferencia de estas proteínas a una

membrana (blot) y finalmente la detección de la/s proteína/s de interés por la unión de un anticuerpo específico.

Los homogenados de proteínas se descongelaron en hielo y se utilizó el volumen necesario para cargar la misma cantidad de proteína en cada carril, en función de los resultados obtenidos en la determinación de la concentración proteína. Siguiendo las especificaciones del sistema XCell4 SureLock™ Midi-Cell (Life technologies), se mezclaron los homogenados con el tampón de muestra 1X NuPAGE LDS (Life technologies), se añadió el agente reductor (Life technologies) y se incubó la muestra a 70°C durante 10 min con el fin de desnaturalizar las proteínas.

Para realizar los pasos de electroforesis y electrotransferencia, se utilizaron las siguientes soluciones que se prepararon el mismo día que se utilizaron a partir de soluciones más concentradas que se guardaban a 4°C.

- *Tampón de electroforesis MOPS/SDS*: 50 mM MOPS, 50 mM Tris, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, pH=7,7.
- *Tampón de transferencia*: 27 mM Tris, 197 mM Glicina y 20% metanol.

A continuación se realizó la electroforesis en geles pre-cast NUPAGE Novex Bis-Tris Gel 10% (Life technologies). Se retiraron los geles de su envase, se lavaron y montaron en el soporte del tanque de electroforesis. Seguidamente se rellenó el tanque con tampón de electroforesis, se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular (MagicMark, Life technologies) y se resolvieron a 200 V durante 55 min.

Al finalizar la electroforesis, se procedió a la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de PVDF-LF (polyvinylidene fluoride - low fluorescence, Immobilon-P, Millipore) previamente activada con metanol. Se hizo el montaje tipo *sandwich* en un *cassette* con unas rejillas específicas sumergido en un tanque con tampón de transferencia. La transferencia se realizó durante 1 h a 100 V y a 4°C.

El siguiente paso consistió en la inmunodetección de las proteínas de interés mediante el uso de anticuerpos específicos. Para ello se utilizaron las siguientes soluciones que se preparaban el día que se iban a utilizar:

- *Tampón de bloqueo para WB*: 50% PBS y 50% Blocking Buffer de Odyssey (Li-COR).
- *Tampón de incubación para WB*: 50% PBS, 50% Blocking Buffer de Odyssey y 0,1% Tween-20 (Sigma-Aldrich).
- *Tampón de lavado para WB*: PBS+ 0,1% Tween-20.

Para el estudio de proteínas fosforiladas en todos los pasos se sustituyó el PBS por TBS.

En primer lugar se bloquearon las membranas durante 1 h con tampón de bloqueo y seguidamente se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente (TA) o toda la noche (O.N, *overnight*) a 4°C con un anticuerpo primario específico para la proteína de interés. Tras la incubación, se realizaron tres lavados de 5 min y las membranas se incubaron durante 45 min resguardadas de la luz con un anticuerpo secundario (que detecta al anticuerpo primario) conjugado con fluoróforos que emiten en el infrarojo cercano (680 nm y/o 800 nm, LICOR). Finalmente se realizaron tres lavados de 5 min con tampón de lavado y un último lavado de 10 min con PBS (o TBS en estudios de proteínas fosforiladas).

Como control de carga de las muestras, se estudió la inmunoreactividad de las proteínas Actina (1:5000, Sigma-Aldrich) o Tubulina (1:5000, Sigma-Aldrich).

La presencia de las proteínas de interés en las membranas se detectó y analizó con un sistema de generación y análisis de imágenes basada en la Fluorescencia del Infrarrojo Cercano de Odyssey (Li-COR). La intensidad de las bandas en las membranas se cuantificó con el programa específico del mismo sistema (software Odyssey V3.0) y así se pudieron comparar los diferentes tratamientos. Los valores densitométricos de las bandas que correspondían a las proteínas de estudio se normalizaron con los valores de las bandas de actina o tubulina correspondientes.

6.6. Inmunocitofluorescencia (ICF)

La ICF es una técnica para la localización de moléculas en células cultivadas mediante el empleo de moléculas específicas fluorescentes llamadas fluoróforos o fluorocromos. Estos fluoróforos emiten luz unos nanosegundos después de haber absorbido luz de menor longitud de onda.

Para el ensayo de ICF se utilizaron las siguientes soluciones preparadas frescas el día del ensayo:

- Solución 4% paraformaldehído (Panreac) - 2% sacarosa (Fluka): Se disolvió 1 g de paraformaldehído en 20 mL de agua miliQ en agitación y a una temperatura de 65°C. Añadimos 20 µL de NaOH 10 M para ayudar en el proceso de disolución. Una vez disuelto se añadieron 2,5 mL de PBS 10X y 0,5 g de sacarosa. Finalmente se ajustó el pH a 7,2 con HCl al 25%. Se filtró y se guardó protegida de la luz a 4°C hasta su utilización.
- *Tampón de bloqueo para ICF: PBS + 3% BSA.*
- *Tampón de incubación para ICF: PBS + 1% BSA.*
- *Tampón de lavado para ICF: PBS + 20 mM de Glicina (Sigma-Aldrich) (para reducir el background de autofluorescencia en la muestra).*

Para el estudio de proteínas fosforiladas en todos los pasos se sustituyó el PBS por TBS.

La ICF se realizó en neuronas corticales 11-12 DIV sembradas en sistemas de cámara de cultivo sobre portaobjetos (Millicell EZ slide de Millipore) o sobre cubreobjetos de 12 mm de grosor dispuestos dentro de los pocillos de las placas. En ambos casos, fueron tratados previamente con 100 µg/ml *poly-L-lysine* y lavados con PBS.

En primer lugar se realizaron tres lavados de 5 min con tampón de lavado y los cultivos se fijaron con 4% paraformaldehído-2% sacarosa en PBS durante 40 min a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 5 min, y las células se permeabilizaron durante 8 min con metanol previamente enfriado -20°C y tras 3 nuevos lavados de 5 min se

bloqueó durante 30 min a TA en tampón de bloqueo. Seguidamente se incubó en la solución de incubación con un anticuerpo primario a la dilución correspondiente (detalladas en los apartados 7.4, 7.5 y 8.4) durante 1-2 h a TA u O.N. a 4°C. Se hicieron 3 lavados de 5 min y se incubó en la solución de incubación con el anticuerpo secundario apropiado unido a un fluorocromo y a la dilución detallada en las tablas de los apartados específicos (7.4, 7.5 y 8.4), durante 45 min a TA y protegido de la luz. De nuevo se lavaron los pocillos y se incubaron con PBS + 0,2 µg/mL de Hoechst-33422 (Life Technologies) durante 10 min a TA. El Hoechst-33422 es un compuesto al cual las células son permeables y que emite fluorescencia azul cuando se une al ADN (ácido desoxirribonucleico, *deoxyribonucleic acid*) de doble cadena. De esta manera se pueden visualizar fácilmente todos los núcleos celulares en una preparación. Se realizaron 3 nuevos lavados de 5 min y se dejaron secar las muestras. En el caso de los sistemas de cámara de cultivo sobre portaobjetos, se separó la cámara de cultivo de los portaobjetos, se añadió una gota de medio de montaje Fluoromount (Sigma) y un cubreobjetos encima. En el caso de los cubreobjetos se colocaron sobre un portaobjetos con una gota de Fluoromount (Sigma). A las 24 h, se sellaron los cubreobjetos a los portaobjetos con pintauñas transparente y se guardaron protegidos de la luz a 4°C.

Adquisición de las imágenes

En los estudios para determinar el efecto de los diferentes tratamientos sobre los niveles de las proteínas de interés, las imágenes se adquirieron en un microscopio invertido Axio Observer Z1, *Apotome inverted microscope* (Carl Zeiss). Para la obtención de las imágenes se utilizó el módulo ApoTome acoplado al microscopio Axio Observer Z1. Se trata de un sistema óptico basado en tres gradillas de diferentes frecuencias, que se modifican según el grosor de la muestra y del fluoróforo utilizado, y se utiliza para prevenir puntos desenfocados y posible ruido de fondo de la muestra. Mediante este sistema se obtienen imágenes de elevado

contraste y una resolución en la dirección Z incrementada respecto a las imágenes realizadas con microscopía de fluorescencia convencional.

Para los estudios de colocalización, las imágenes se adquirieron con un microscopio invertido Axio Observer Z1 acoplado a un módulo confocal Zeiss LSM 710 equipado con 7 líneas de láseres (405, 458-488-514, 543, 594, 633) y software de adquisición y análisis de imágenes ZEN black 2012 (Carl Zeiss).

En ambos casos se utilizó la función Z-Stack que permitió la obtención de 10 secciones ópticas en el eje Z, obteniendo secciones de $0,5\ \mu\text{m}$ separadas entre sí por $0,5\ \mu\text{m}$ (Figura 16). Estas secciones son, según nuestra experiencia, suficientes para permitir estudiar la totalidad de la neurona.

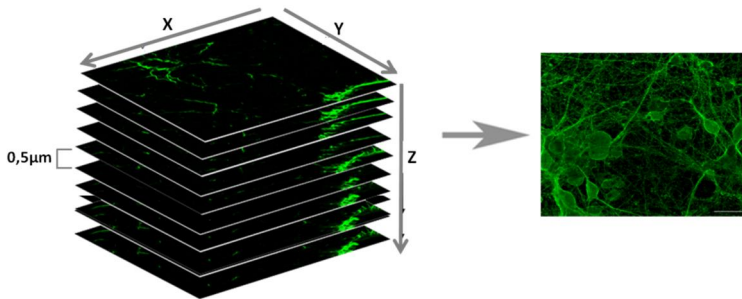


Figura 16. Esquema del método de adquisición de las imágenes. Se tomaron 10 secciones ópticas de $0,5\ \mu\text{m}$ para cada campo analizado del pocillo. Mediante el software Axiovision se obtuvo también la imagen completa (proyección) formada por las 10 secciones ópticas.

Para comprobar que la señal fluorescente era debida exclusivamente a la detección específica de anticuerpo primario, se realizaron controles negativos en los que se omitió la presencia de anticuerpo primario en la incubación. Estos controles negativos nos permitieron determinar el nivel de exposición máximo de cada fluoróforo para que la señal obtenida fuese debida únicamente a la proteína de estudio.

Para la caracterización de la pureza de los cultivos, porcentaje de neuronas GABAérgicas y la expresión de las subunidades NR2A y NR2B en neuronas de

12 DIV se adquirieron las imágenes con el microscopio Axio Observer Z1 y se realizaron 10 secciones ópticas. La adquisición y análisis de las imágenes específica de cada uno de los estudios realizados en esta tesis doctoral se detallan en los correspondientes apartados metodológicos (7.4, 7.5 y 8.4). Los anticuerpos utilizados en el apartado de caracterización fueron los siguientes:

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en la caracterización del cultivo primario de neuronas corticales.

Anticuerpos Primarios	Dilución	Casa comercial
<i>Mouse anti-NMDAR subunit NR2A</i>	1:100	Millipore
<i>Mouse anti-NMDAR subunit NR2B</i>	1:100	Millipore
<i>Mouse anti-microtubule-associated protein 2 (MAP-2)</i>	1:500	Sigma-Aldrich
<i>Rabbit anti-glia Fibrillary Acidic Protein (GFAP)</i>	1:2000	Dako
Anticuerpos Secundarios	Dilución	Casa comercial
AlexaFluor 488 <i>donkey anti-mouse</i>	1:200	Life technologies
AlexaFluor 555 <i>donkey anti-mouse</i>	1:200	Life technologies
AlexaFluor 488 <i>donkey anti-rabbit</i>	1:200	Life technologies

6.7. Análisis estadístico

Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar y se procesaron con el paquete de software estadístico *Graph Pad*. Cuando se compararon los valores promedio de dos grupos de tratamiento (Control y OGD/R), se estudió la significación estadística mediante el test *t de Student*. Para los experimentos en los que se compararon los valores promedio de varios grupos (Control- vehículo, Control-tratado, OGD-vehículo, OGD-tratado) se realizó el test *ANOVA* de dos factores para determinar si existían diferencias significativas entre las medias y si había interacción entre ellas. Seguidamente se utilizó el test de Bonferroni para comparaciones entre medias individuales.

En todos los casos se estudió en primer lugar la homogeneidad de la varianza. En aquellos casos en los que hubo diferencias significativas en la homogeneidad de la varianza, se transformaron los datos a su logaritmo en base 10 y se volvieron a analizar estadísticamente. Se consideró que los datos eran significativamente diferentes cuando p fue inferior a 0,05 y se representó de la siguiente manera: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

7. METODOLOGÍA ESPECÍFICA PARA LA PARTE 1: Intervención sobre NMDARs sinápticos

Los objetivos específicos de la primera parte de esta tesis doctoral se dirigieron al estudio del efecto de la activación de NMDARs sinápticos tras la OGD/R sobre la expresión de pCREB, así como al establecimiento de un posible tratamiento farmacológico que actuara sobre este factor de transcripción y protegiera a las neuronas de la OGD/R.

7.1. Inducción farmacológica de los niveles de pCREB mediante la activación de NMDARs sinápticos

Varios autores han descrito que la activación específica de NMDARs sinápticos induce la activación y fosforilación de CREB mientras que la activación de NMDARs extrasinápticos bloquea esta vía de activación (Hardingham and Bading, 2002; Terasaki et al., 2010). Para inducir este efecto sobre la activación de CREB mediante la activación de NMDARs sinápticos nos basamos en protocolos descritos previamente (Hardingham and Bading, 2002; Ivanov et al., 2006; Leveille et al., 2010). En la siguiente tabla se detallan los compuestos que se utilizaron para esta inducción farmacológica y sus respectivas funciones.

Tabla 3. Compuestos utilizados en el protocolo de inducción farmacológica de los niveles de pCREB mediante la activación de NMDARs sinápticos.

Compuesto	Concentración	Función	Casa comercial
<i>(2R)-amino-5-phosphonovaleric acid (D-AP5)</i>	100 μ M	Antagonista competitivo de NMDARs	Sigma-Aldrich
<i>6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX)</i>	40 μ M	Antagonista competitivo de receptores AMPA y kainato	Sigma-Aldrich
<i>Bicuculine</i>	10 μ M	Antagonista competitivo de los receptores GABA	Sigma-Aldrich
<i>Glicine</i>	10 μ M	Co-agonista de los NMDARs	Sigma-Aldrich
<i>Nifepidine</i>	5 μ M	Bloquea canales de Ca^{2+}	Sigma-Aldrich
NMDA	100 μ M	Agonista de glutamato que se une a NMDARs y los activa	Sigma-Aldrich
Ro25-6981	10 nM	Inhibidor específico de NMDARs-NR2B	Sigma-Aldrich
<i>Tetrodotoxin (TTX)</i>	1 μ M	Bloquea canales de Na^{+}	Sigma-Aldrich

7.1.1. Pretratamiento para unificar el estado de actividad excitatoria tras la OGD

Al finalizar los 90 minutos de OGD y previamente a la activación farmacológica de los NMDARs sinápticos, sustituimos el medio control u OGD por medio de preincubación (DMEM suplementado con 25 mM glucosa al que se añadió 40 μ M CNQX, 100 μ M D-AP5, 5 μ M de nifepidina y 1 μ M de TTX. De esta manera se inhibió de forma transitoria la neurotransmisión a través de receptores AMPA/Kainato, NMDARs, canales de Ca^{2+} y canales de Na^{+} , respectivamente (ver tabla 2). Este pretratamiento se realizó tanto en cultivos sometidos a OGD/R como en controles basales, refiriéndonos como controles basales a cultivos que no había sido sometidos a ningún cambio previo a este pretratamiento (Figura 17).

En el protocolo original en el que nos hemos basado (Ivanov et al., 2006), los autores observaron que la omisión de este paso previo resultaba en una elevada variabilidad de la actividad basal de algunas de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs: *Extracellular signal-regulated kinases*) en condiciones control y que disminuía el número de neuronas que mostraban activación de ERKs tras la activación de la actividad sináptica mediante administración de bicuculina o NMDA. En este estudio los autores realizaban este paso de preincubación durante 3 h, en nuestras condiciones experimentales observamos que una preincubación de 30 min a 37°C era suficiente para evitar la variabilidad asociada a la no-sincronización de los potenciales de acción en las neuronas de nuestros cultivos.

7.1.2. Activación selectiva de los NMDARs sinápticos

Para activar selectivamente NMDARs sinápticos utilizamos dos protocolos diferentes:

Protocolo 1 (Syn1)

Para activar los NMDARs sinápticos, se retiró el medio de preincubación y se lavó con medio Syn1 (DMEM fresco suplementado con 25 mM glucosa, 10 μ M bicuculina, 10 μ M glicina y 5 μ M nifepidina) para eliminar posibles restos de TTX, D-AP5 y CNQX. Posteriormente se expusieron las neuronas a este medio Syn1 durante 10 min a 37°C. La exposición a bicuculina en presencia del inhibidor de canales de Ca^{2+} nifepidina, provoca la liberación de glutamato en los terminales sinápticos y en consecuencia, la activación de NMDARs sinápticos (Hardingham and Bading, 2002; Ivanov et al., 2006; Liu et al., 2007).

Protocolo 2 (Syn2)

Para activar los NMDARs sinápticos mediante este protocolo, se retiró el medio de preincubación y se lavó con medio Syn2 (DMEM fresco suplementado con 25 mM glucosa, 100 μ M NMDA, 10 nM Ro25-6981, 10 μ M glicina y 5 μ M nifepidina) para eliminar posibles restos de TTX, D-AP5 y CNQX. Posteriormente se expusieron las neuronas a este medio Syn2 durante 10 min a 37°C. Con este protocolo se activaron los NMDARs sinápticos y extrasinápticos mediante la administración de 100 μ M NMDA (*N-Methyl-D-aspartic acid*, agonista de los NMDARs) a la vez que se inactivaron los NMDARs extrasinápticos con un inhibidor selectivo de la subunidad NR2B, Ro25-6981, subunidad que, según lo que se ha descrito en la bibliografía, está presente principalmente en las zonas extrasinápticas (Tovar and Westbrook, 1999, Hardingham and Bading, 2002) (Vizi et al., 2013). El compuesto NMDA tiene la capacidad de activar la totalidad de los NMDARs pero en presencia del compuesto Ro25-6981 se produce la inactivación de los receptores extrasinápticos, restando activos únicamente los NMDARs sinápticos.

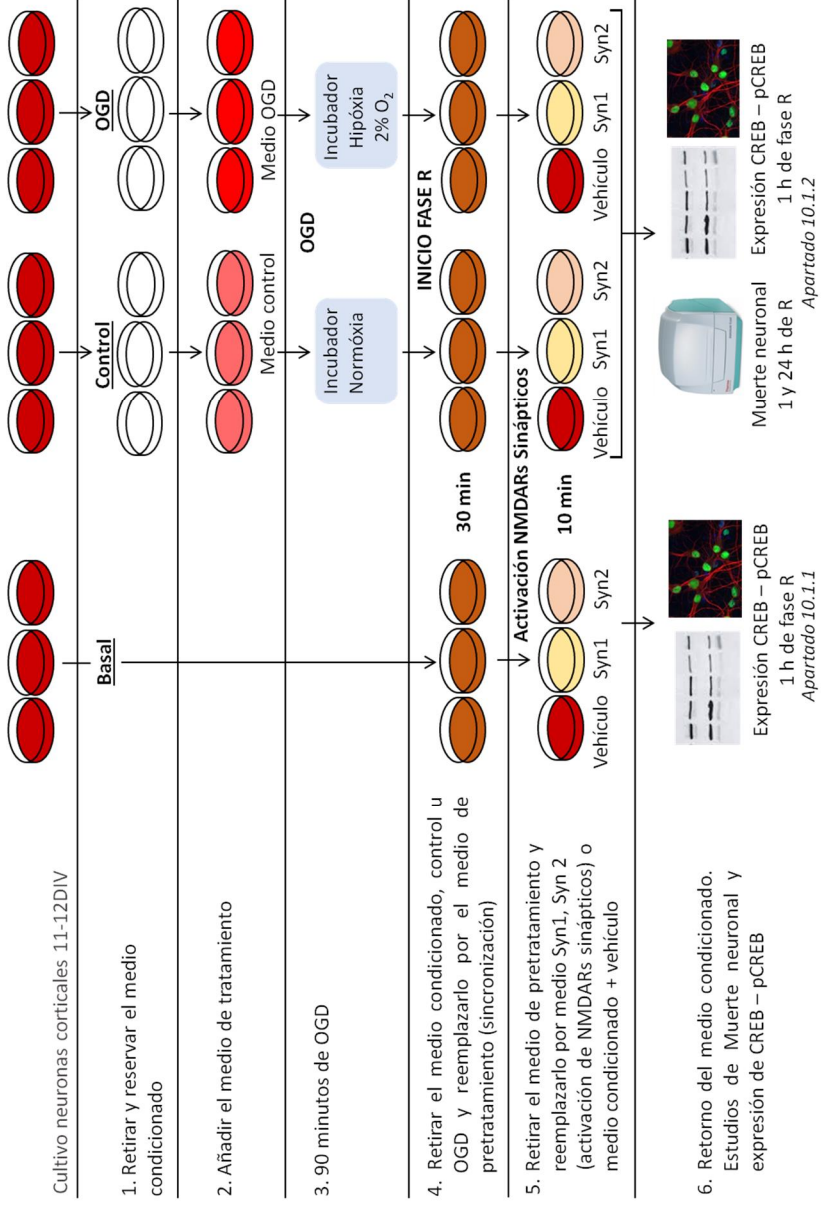


Figura 17 . Esquema explicativo del procedimiento de activación de NMDARs sinápticos en cultivos de neuronas corticales basales (izquierda), controles (centro) o sometidos a OGD/R (derecha). Se realizaron 3 experimentos independientes para cada determinación.

7.2. Tratamiento con Atorvastatina o su Metabolito de cultivos neuronales sometidos a OGD/R

Se prepararon soluciones stock a 5 mM de Atorvastatina (ATV) o su metabolito (o-ATV) disolviendo los viales cedidos por Pfizer S.A. en DMSO, se alicuotaron y se guardaron a -20°C. Al realizar el tratamiento se diluyó este stock para obtener las concentraciones deseadas de los fármacos, 100 y 600 nM. La concentración final máxima de DMSO en el medio de cultivo fue de 0,012%, concentración que no afecta a la viabilidad celular de los cultivos corticales (Hanslick et al., 2009). El tratamiento con vehículo contenía también esta concentración de DMSO.

Las concentraciones que se utilizaron de ambos compuestos fueron 600 nM y 100 nM. Bosel J. y cols. demostraron que el tratamiento con 1 µM de ATV es tóxico en cultivos neuronales. Se eligió la concentración de 600 nM porque vimos que era suficiente para tener el efecto deseado, alargaba la protección a 24 h y, además, se encuentra por debajo de la concentración (1 µM) de ATV que produce un efecto neurotóxico (Schulz et al., 2004; Bosel et al., 2005a; Bosel et al., 2005b). Por otro lado, se testó la concentración de 100 nM debido a que está comprendida en el rango de concentración de o-ATV hallada en suero de pacientes tratados con ATV (Lins et al., 2003; Guillen et al., 2009) y que además ha demostrado eficacia frente a la muerte por glutamato en cultivos neuronales (Bosel et al., 2005).

Para estudiar el efecto de ATV y o-ATV en la muerte neuronal inducida por OGD/R se sometieron los cultivos de neuronas corticales a 90 min de OGD. ATV u o-ATV se añadieron a las concentraciones mencionadas al medio de cultivo condicionado que habíamos reservado inmediatamente antes de retornarlo a las células al finalizar los 90 min de OGD y se mantuvieron a lo largo de la fase R (Figura 18). El efecto de estos tratamientos sobre la expresión de pCREB se estudió dentro de la primera hora de fase R. La muerte neuronal se determinó a los 15 min, 1 h y 24 h la fase R mediante la cuantificación de la incorporación de PI (apartado 6.3).

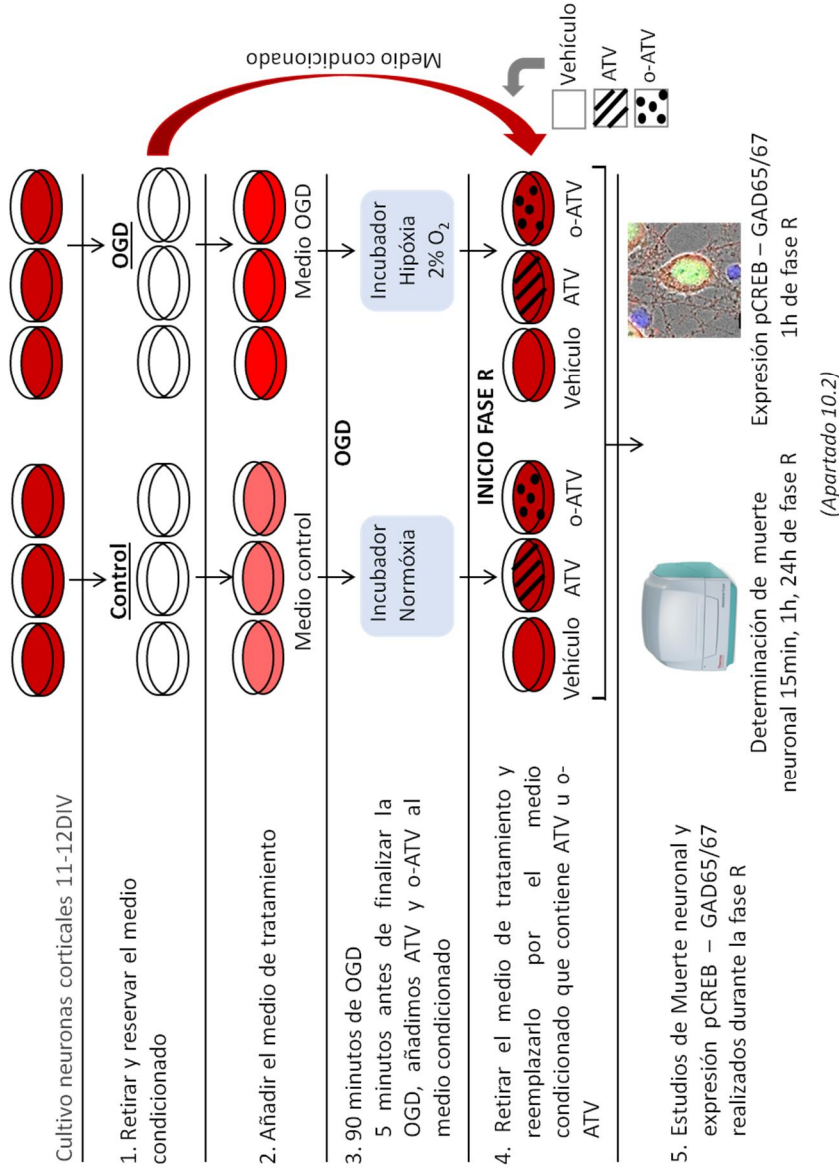


Figura 18. Esquema explicativo del procedimiento de OGD/R y los posteriores tratamientos con ATV u o-ATV. Se realizaron 3 experimentos independientes para cada determinación.

7.3. Estudio de los niveles proteicos de CREB y pCREB mediante WB

Para estudiar los niveles proteicos de CREB y pCREB en cultivos de neuronas corticales tras la activación de NMDARs sinápticos se siguió el protocolo de WB detallado previamente en el apartado 6.5. Se partió de extractos de proteína obtenidos a partir de dos pocillos de una placa de 24 y se cargaron 20 µg de proteína por carril. Como control de carga de muestras se utilizó la proteína tubulina. Los valores densitométricos de las bandas correspondientes a CREB se normalizaron con los valores de las bandas de tubulina correspondientes y seguidamente calculamos el ratio pCREB/CREB. Se realizaron 3 experimentos independientes con 6 réplicas por condición en cada uno de ellos. Los anticuerpos específicos utilizados fueron:

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en el estudio de los niveles proteicos de CREB y pCREB mediante WB

Anticuerpos Primarios	Dilución	Casa comercial
<i>Mouse anti-cAMP response element-binding protein (CREB)</i>	1:75	Millipore
<i>Mouse anti-Tubulin</i>	1:5000	Sigma-Aldrich
<i>Rabbit anti-phospho cAMP response element-binding protein, Ser133 (pCREB)</i>	1:150	Millipore
Anticuerpos Secundarios	Dilución	Casa comercial
IRDye 680 <i>Donkey Anti-mouse</i>	1:15000	Li-COR
IRDye 800 <i>Donkey Anti-mouse</i>	1:15000	Li-COR
IRDye 680 <i>Donkey Anti-rabbit</i>	1:15000	Li-COR

7.4. Estudio de pCREB, GAD65/67 y 4-HNE mediante ICF

Para todos los estudios realizamos tres experimentos independientes y se adquirieron 10 campos diferentes por condición y experimento. En cada experimento independiente se utilizaron controles negativos para establecer el umbral por debajo del cual la señal obtenida era específica de las proteínas de interés y se adquirieron las imágenes con el mismo tiempo de exposición para cada fluoróforo.

Se determinó el efecto de la activación de NMDARs sinápticos y del tratamiento con ATV u o-ATV sobre la expresión de pCREB, GAD65/67 y 4-HNE mediante ensayos de ICF. En ambos casos se partió de neuronas corticales de 11-12 DIV sembradas en sistemas de cámara de cultivo sobre portaobjetos (Millicell EZ slide de Millipore) previamente tratados con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *poly-L-lysine*. Las imágenes se adquirieron en un microscopio invertido *Axio Observer Z1, Apotome inverted microscope* (Carl Zeiss) mediante la adquisición de 10 secciones ópticas de 0,5 μm .

Estudio de la activación de NMDARs sinápticos sobre pCREB

En el estudio de la activación de NMDARs sinápticos sobre pCREB, se realizó la proyección de las 10 secciones ópticas adquiridas utilizando la función *MaximumProjection* del software *Axiovision* (Carl Zeiss). Seguidamente realizamos el conteo manual de núcleos totales (marcados en azul por Hoechst) y de células que expresaban pCREB en cada campo. Los resultados se mostraron como el porcentaje de neuronas que expresaban pCREB respecto al total de neuronas (núcleos) de cada campo analizado.

Estudio del efecto del tratamiento con ATV u o-ATV sobre pCREB, GAD65/67 y 4-HNE

Para analizar el efecto del tratamiento con ATV u o-ATV sobre la activación de CREB también se realizó la proyección de las diez secciones ópticas mediante la función *MaximumProjection* del software *Axiovision* (Carl Zeiss). Seguidamente se

contaron manualmente los núcleos totales (marcados en azul por Hoechst) de neuronas que expresaban pCREB, neuronas que expresaban GAD65/67 y de neuronas positivas para GAD65/67 que además expresaban pCREB. Realizamos los contajes en cada campo adquirido y se mostraron los resultados como el porcentaje de neuronas que expresaban GAD65/67 respecto al total de neuronas (núcleos) de cada campo o de neuronas positivas para GAD65/67 y pCREB respecto al total de núcleos de cada campo analizado.

Por otro lado, también se analizó el efecto del tratamiento con ATV u o-ATV sobre la intensidad (OD, *optical density*) de pCREB. La cuantificación de la intensidad se realizó como en los anteriores ensayos, en imágenes adquiridas siempre en las mismas condiciones de tiempo de exposición para cada fluoróforo y de nuevo se utilizaron los valores de fluorescencia de la señal de los anticuerpos secundarios utilizados en los controles negativos para establecer el umbral de la señal inespecífica de cada fluoróforo. Esto determinó el tiempo de exposición máximo a partir del cual la señal obtenida se debía únicamente a la presencia de la proteína estudiada. Se realizó la cuantificación de la intensidad con el software ImageJ (Dr.W.Rasband, NIH) en cada una de las secciones ópticas de la imagen y se realizó el sumatorio para obtener el valor de intensidad del campo analizado en todas sus dimensiones. Se realizó el contaje manual de núcleos totales en cada campo y se mostraron los resultados como intensidad (OD) respecto al número de núcleos totales.

Se analizó también el efecto de estos tratamientos sobre el compuesto *4-hydroxynonenal* (4-HNE), compuesto resultante de la peroxidación lipídica y ampliamente conocido como marcador de estrés oxidativo (Niki, 2009). La peroxidación lipídica es un proceso disparado por los elevados niveles de radicales libres producidos durante la isquemia y que provoca daño en los lípidos de membrana (Esterbauer et al., 1987; Esterbauer et al., 1991, Cheeseman and Slater, 1993). El compuesto 4-HNE es liberado durante este proceso y provoca la modificación de proteínas de citoesqueleto y transportadores de glutamato entre

otras, generando daño axonal, producción de radicales libres e incremento de Ca^{2+} intracelular (Comporti, 1989; McCracken et al., 2001). En 2013 un estudio demostró que ATV presenta la capacidad de reducir los niveles de estrés oxidativo actuando sobre este compuesto 4-HNE (Kurata et al., 2013). Para determinar si el efecto neuroprotector del tratamiento con o-ATV era debido, en parte, a un efecto antioxidante se estudiaron los niveles de 4-HNE en cultivos neuronales sometidos a OGD/R. La cuantificación de intensidad de 4HNE se realizó siguiendo las indicaciones para pCREB y detalladas en el párrafo anterior. Los anticuerpos utilizados en esta primera parte del estudio fueron:

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en el estudio de la expresión de pCREB, GAD65/67 y 4-HNE mediante ICF

Anticuerpos Primarios	Dilución	Casa comercial
<i>Mouse anti-microtubule-associated protein 2 (MAP-2)</i>	1:500	Sigma-Aldrich
<i>Goat anti- glutamate decarboxylase isoforms 65/67 (GAD65/67)</i>	1:60	Santa Cruz Biotechnology
<i>Rabbit anti-4 Hydroxynonenal (4-HNE)</i>	1:750	Alexis Corporation
<i>Rabbit anti-phospho cAMP response element-binding protein, Ser133 (pCREB)</i>	1:150	Millipore
Anticuerpos Secundarios	Dilución	Casa comercial
<i>AlexaFluor 488 donkey anti-mouse</i>	1:200	Life technologies
<i>AlexaFluor 555 donkey anti-mouse</i>	1:200	Life technologies
<i>AlexaFluor 555 donkey anti-goat</i>	1:200	Life technologies
<i>AlexaFluor 488 donkey anti-rabbit</i>	1:200	Life technologies
<i>AlexaFluor 555 donkey anti-rabbit</i>	1:200	Life technologies

7.5. Estudio de la colocalización de las subunidades NR2A y NR2B con neurologina

La colocalización mediante microscopía confocal permite determinar si dos (o más) moléculas de interés se expresan simultáneamente en un mismo vóxel (píxel tridimensional) de una preparación. Se pone de manifiesto mediante la visión de la mezcla de colores de los diferentes fluorocromos/marcadores. El microscopio de fluorescencia confocal permite la adquisición de imágenes digitales de alta resolución correspondientes a la fluorescencia producida en distintos planos de foco (confocal), y produce secciones ópticas a lo largo del eje z de una muestra marcada con uno o varios fluorocromos. Esto es posible porque, por una parte, la fuente de iluminación utilizada es láser, en la que el haz de luz se mantiene perfectamente lineal al propagarse. Por otra parte, en los microscopios confocales existe una pieza llamada "diafragma de detección confocal" o "*pinhole*", que consiste en un pequeño orificio en el filtro detector de la luz que impide el paso de la señal que procede de los planos de la muestra que no están enfocados. Así, se obtiene sólo la información de la región enfocada, denominada "plano focal", y se elimina el resto. Como resultado final se logran imágenes de mejor calidad, como cortes virtuales de las muestras analizadas. Desde el punto de vista digital, 2 fluorocromos colocalizan cuando su emisión coincide en un mismo vóxel.

Para los estudios de colocalización entre las subunidades NR2A y NR2B de los NMDARs y el marcador sináptico neurologina en condiciones control u OGD/R1h, se partió de neuronas corticales de 11-12 DIV sembradas sobre cubreobjetos de 12 mm de grosor dispuestos dentro de los pocillos de las placas previamente tratados con 100 µg/ml poly-L-lysina y lavados con PBS. Se realizaron 3 experimentos independientes y se adquirieron 15 campos por condición y experimento. Las imágenes se adquirieron con un microscopio invertido Axio Observer Z1 acoplado a un módulo confocal Zeiss LSM 710 equipado con 7 líneas de láseres, mediante la adquisición de 10 secciones ópticas de 0,5 µm. Se

analizaron las imágenes obtenidas mediante el software ZEN Black 2012 (Carl Zeiss).

Para cada sección óptica se analizó el grado de colocalización teniendo en cuenta los valores de las intensidades en cada uno de los canales (rojo y verde) mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson (r_p) (Manders et al., 1992). El software realiza el cálculo de este coeficiente mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$r_p = \frac{\sum((R_i - R_{med})(V_i - V_{med}))}{\sqrt{\sum(R_i - R_{med})^2 \sum(V_i - V_{med})^2}}$$

Donde R_i y V_i se refieren a los valores de intensidad del vóxel i de los canales rojo y verde, respectivamente y R_{med} y V_{med} se refieren a las intensidades medias de los canales rojo y verde, respectivamente, para la totalidad de los vóxeles que conforman la imagen.

Este coeficiente representa el porcentaje de colocalización de los píxeles en ambos canales. La colocalización puede ir de 0 a 1 (en porcentaje 0-100%). Un valor $r_p = 1$ significa q las intensidades para cada canal de los voxels de una imagen están perfectamente solapados. Los valores cercanos a cero reflejan distribuciones de las intensidades para cada canal que no están correlacionados en absoluto.

Se adquirieron los valores correspondientes al coeficiente de Pearson calculado por el software para cada sección óptica de las muestras, y se calculó la media de los valores de las secciones para obtener un valor de coeficiente de Pearson de la imagen completa. Los anticuerpos utilizados para el estudio de colocalización fueron:

Tabla 6. Anticuerpos utilizados en el estudio de la colocalización de las subunidades NR2A y NR2B con neurologina

Anticuerpos Primarios	Dilución	Casa comercial
<i>Mouse anti-NMDAR subunit NR2A</i>	1:100	Millipore
<i>Mouse anti-NMDAR subunit NR2B</i>	1:100	Millipore
<i>Goat anti-neurologin 1</i>	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Anticuerpos Secundarios	Dilución	Casa comercial
AlexaFluor 488 <i>donkey anti-mouse</i>	1:200	Life technologies
AlexaFluor 555 <i>donkey anti-goat</i>	1:200	Life technologies

8. METODOLOGÍA ESPECÍFICA PARA LA PARTE 2: Intervención sobre NMDARs extrasinápticos

Los objetivos específicos de la segunda parte de la presente tesis doctoral se dirigieron a la identificación de moléculas que actuaran en la vía de señalización hacia muerte neuronal de los NMDARs extrasinápticos sobre las que se pudiese intervenir para proteger a las neuronas del daño excitotóxico.

8.1. Modelos animales

Para investigar si el efecto observado en el procesamiento proteolítico de NR2B, DAPK1 y GIPC en nuestro modelo OGD/R se observaba también en el ictus experimental *in vivo*, sometimos ratas *Sprague Dawley* a la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO, *Middle cerebral artery (MCA) occlusion*) mediante dos técnicas diferentes: Oclusión transitoria de la MCA (t-MCAO) por ligadura y por filamento intraluminal. En ambos modelos se produce una lesión en el hemisferio correspondiente a la MCA ocluida (siempre cortical en el caso del modelo de ligadura; cortical y subcortical en el caso del modelo de filamento intraluminal)

que se evalúa mediante la técnica de tinción con *2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride* (TTC) a las 24 h de haber realizado la oclusión. Esta técnica permite visualizar la zona de tejido infartado que no queda teñido por el TTC. En ambos modelos, las lesiones que se observan son reproducibles. Para ambos modelos expusimos 6 ratas a tMCAO y utilizamos la información anatómica antes mencionada para diseccionar la zona potencialmente isquémica y la correspondiente zona contralateral 2 h después del inicio de la reperusión (a 2 h post isquemia no se puede visualizar, mediante la tinción por TTC, la zona potencialmente dañada y por lo tanto se tiene que predecir en base a la reproducibilidad de los modelos). Para la homogenización del tejido se utilizó el sistema *GentleMac* y un buffer compuesto por 65,5 mM Tris-Cl pH 6,8, 2% SDS y 10% glicerol y posteriormente se realizó la técnica de WB (apartado 6.5). En los estudios *in vivo* comparamos los niveles y las bandas de DAPK1, NR2B y GIPC en el hemisferio ipsilateral con la expresión de estas proteínas en el hemisferio contralateral (hemisferio sano) de cada animal.

8.1.1. Oclusión transitoria de la arteria cerebral media (t-MCAO) por ligadura

La tMCAO por ligadura (MCAO-L) se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Chen ST. y cols. (Chen et al., 1986) con pequeñas modificaciones. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron usando un microscopio quirúrgico. Las ratas se anestesiaron con isoflurano al 5% y se mantuvieron con isoflurano al 1,5% durante la cirugía y la reperusión temprana. Se hizo una oclusión transitoria por ligadura de las arterias carótidas comunes bilaterales con una sutura de seda 4-0. Mediante craneotomía se dejó al descubierto la MCA y bajo un microscopio binocular quirúrgico se procedió a realizar la oclusión por ligadura transitoria con una sutura de seda 10-0. Una hora más tarde, se deshicieron todas las oclusiones, se retiraron las suturas y se comprobó visualmente la restauración inmediata del flujo de sangre. Después de la cirugía se administró analgesia por inyección

intraperitoneal de meloxicam (2 mg/Kg, Metacam[®]), los animales se devolvieron a sus jaulas y se permitió el libre acceso a agua y alimentos.

8.1.2. Oclusión transitoria de la arteria cerebral media (t-MCAO) por filamento intraluminal

La tMCAO por filamento intraluminal (MCAO-F) se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Longa EZ. y col. (Longa et al., 1989) con pequeñas modificaciones. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron usando un microscopio quirúrgico. Se anestesió al animal con Sevoflurano al 6% y se mantuvo al 3% durante el procedimiento quirúrgico. Un filamento de 4-0 de nylon con un engrosamiento de silicona en la punta se insertó por la arteria carótida derecha interna hasta el origen de la arteria cerebral media. Se realizó una oclusión por ligadura transitoria de la carótida izquierda. Se comprobó mediante laser Doppler la caída de flujo, indicadora de la oclusión, y se monitorizó durante los 90 min que dura la oclusión. El filamento y la sutura de la carótida contralateral se retiraron cuidadosamente para permitir la reperusión. Después de la cirugía se administró analgesia por inyección intraperitoneal de meloxicam (2 mg/Kg, Metacam[®]), los animales se devolvieron a sus jaulas y se permitió el libre acceso a agua y alimentos.

8.2. Obtención de muestras de membrana plasmática neuronal

Para obtener muestras de membrana plasmática a partir de cultivos adherentes de neuronas corticales se siguió el protocolo descrito por Bezrukov L 2009 (Bezrukov et al., 2009), que permite eliminar el citoplasma de las células (y por tanto los complejos citoplasmáticos) por métodos físicos sencillos y deja adheridos a la placa solamente los fragmentos de membrana. Este método se basa en la adhesión especialmente fuerte de las neuronas a una capa de *poly-L-lysine* preparada en tampón borato 0,15 M (50 mM *boric acid* (Sigma-Aldrich) y 12,5 mM *sodium tetraborate* ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 8,3) (Fluka)) seguido de lisis hipotónica con agua destilada a 4°C y varios pasos de lavado. La contaminación de la

membrana plasmática aislada por orgánulos celulares es menor al 5% (Bezrukov et al., 2009).

Previamente al cultivo de las neuronas corticales, se trataron placas Petri (56,7 mm²) con una solución de 250 µg/ml de *poly-L-lysine* disuelta en tampón borato a 37°C ON para incrementar la adhesión de las neuronas a la superficie de la placa. Al día siguiente se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril para eliminar el exceso de *poly-L-lysine*. El cultivo de las neuronas corticales se realizó siguiendo el protocolo habitual detallado en el apartado 6.1. A los 11-12 DIV, se retiró el medio condicionado y se hicieron tres lavados con TBS para eliminar neuronas no adheridas a la placa. Para la disrupción celular se incubaron los cultivos con 10 mL de agua destilada estéril a 4°C durante 1 min. Seguidamente se hicieron dos lavados con 10 mL de TBS para retirar los restos intracelulares. Se repitieron los pasos de disrupción celular dos veces más. En este punto en que queda solamente la membrana plasmática adherida a la placa, se realizó la extracción de proteína siguiendo el protocolo del apartado 6.4.1.

8.3. Estudio de los niveles proteicos de pDAPK1, DAPK1, NR2B y GIPC mediante WB

Para estudiar los niveles totales de pDAPK1, DAPK1, NR2B y GIPC se partió de extractos de proteína obtenidos a partir de dos pocillos de una placa de cultivo de 24 y se cargaron 20 µg de proteína por carril. En el caso de las muestras de animales MCAO se cargaron 25 µg de proteína por carril. En ambos casos, como control de carga de muestras se utilizó la proteína actina, y posteriormente los valores densitométricos de las bandas correspondientes a pDAPK1, DAPK1, NR2B y GIPC se normalizaron con los valores de las bandas de actina correspondientes. Se realizaron 3 experimentos independientes con 5 réplicas por condición en cada uno de ellos. Los anticuerpos específicos utilizados fueron:

Tabla 7. Anticuerpos utilizados en el estudio de la expresión de DAPK1 y proteínas co-inmunoprecipitadas mediante WB

Anticuerpos Primarios	Dilución	Casa comercial
<i>Mouse anti-phospho death associated protein kinase 1, Ser308 (pDAPK1)</i>	1:50	Sigma-Aldrich
<i>Mouse anti-NMDAR subunit NR2B</i>	1:100	Millipore
<i>Goat anti-GAIP interacting protein at C terminus (GIPC), Ab D19</i>	1:100	Santa Cruz Biotechnology
<i>Goat anti-GAIP interacting protein at C terminus (GIPC), Ab C20</i>	1:100	Santa Cruz Biotechnology
<i>Rabbit anti-Actin</i>	1:5000	Sigma-Aldrich
<i>Rabbit anti-death associated protein kinase 1 (DAPK1)</i>	1:400	Sigma-Aldrich
Anticuerpos Secundarios	Dilución	Casa comercial
IRDye 680 Donkey Anti-mouse	1:15000	Li-COR
IRDye 800 Donkey Anti-mouse	1:15000	Li-COR
IRDye 680 Donkey Anti-goat	1:15000	Li-COR
IRDye 800 Donkey Anti-goat	1:15000	Li-COR
IRDye 680 Donkey Anti-rabbit	1:15000	Li-COR
IRDye 800 Donkey Anti-rabbit	1:15000	Li-COR

8.4. Estudio de DAPK1, NR2B y GIPC mediante ICF

Se realizaron ensayos de ICF para estudiar las proteínas NR2B, DAPK1 y GIPC en cultivos de neuronas corticales control o sometidos a OGD/R30min (apartado 6.2). Se parti6 de neuronas corticales 11-12 DIV sembradas en sistemas de c6mara de cultivo sobre portaobjetos (Millicell EZ slide de Millipore) previamente tratados con 100 µg/ml *poly-L-lysine* y lavados con PBS. Las im6genes se adquirieron en un microscopio invertido *Axio Observer Z1, Apotome inverted microscope* (Carl Zeiss, GA) mediante la adquisici6n de 10 secciones 6pticas de 0,5 µm.

Se cuantificó la intensidad de señal de las proteínas en imágenes adquiridas en las mismas condiciones de tiempo de exposición y siempre por debajo del umbral determinado por los controles negativos realizados para cada anticuerpo. Se cuantificó la intensidad en cada una de las secciones ópticas y se realizó el sumatorio para obtener el valor total de señal de cada proteína. Se normalizaron los valores de intensidad con el número de núcleos totales presentes en cada campo. Los anticuerpos utilizados fueron:

Tabla 8. Anticuerpos utilizados en el estudio de la expresión de DAPK1, NR2B y GIPC mediante ICF

Anticuerpos Primarios	Dilución	Casa comercial
<i>Mouse anti-NMDAR subunit NR2B</i>	1:100	Millipore
<i>Goat anti-GAIP interacting protein at C terminus (GIPC), Ab D19</i>	1:100	Santa Cruz Biotechnology
<i>Goat anti-GAIP interacting protein at C terminus (GIPC), Ab C20</i>	1:100	Santa Cruz Biotechnology
<i>Rabbit anti-death associated protein kinase 1 (DAPK1)</i>	1:400	Sigma-Aldrich
Anticuerpos Secundarios	Dilución	Casa comercial
<i>AlexaFluor 488 donkey anti-mouse</i>	1:200	Life technologies
<i>AlexaFluor 555 donkey anti-goat</i>	1:200	Life technologies
<i>AlexaFluor 555 donkey anti-rabbit</i>	1:200	Life technologies

8.5. Co-inmunoprecipitación (Co-IP) de los interactomas de DAPK1 y GIPC

Para estudiar las proteínas unidas a la subunidad NR2B de los NMDARs tras un estímulo excitotóxico producido por OGD/R30min, utilizamos la técnica de coimmunoprecipitación (Co-IP) utilizando el *Dynabeads Co-Immunoprecipitation Kit* (Life Technologies). El ensayo de Co-IP permite estudiar cómo interactúan las proteínas para otorgar funcionalidad y sincronización a procesos concretos. A este

conjunto de proteínas que interaccionan entre sí se le puede denominar interactoma. En una solución, la proteína de interés se aísla con un anticuerpo específico acoplado a un sustrato sólido. Las moléculas que interaccionan con la proteína se identifican posteriormente mediante técnicas específicas como espectrometría de masas o WB.

Para identificar proteínas que actúan en la vía de señalización hacia muerte neuronal inducida por NMDARs extrasinápticos (NMDARs-NR2B), se utilizó como cebo la proteína DAPK1 que se une específicamente a esta subunidad de los NMDARs potenciando su efecto neurotóxico (Tu et al., 2010) o la proteína GIPC descrita también como de interacción preferente con NR2B (Yi et al., 2007). Mediante este ensayo se procedió a aislar el interactoma que se une a la proteína cebo en muestra procedente de extractos celulares totales o de membrana plasmática.

Preparación de la muestra

Las muestras se extrajeron de cultivos puros de neuronas corticales cultivados en 10 placas de petri de 56,7 cm² para cada condición y cada experimento, tratadas previamente con 20 µg/ml de *poly-L-Lysine* para muestra total y con 250 µg/ml de *poly-L-Lysine* disuelta en tampón borato para muestra de membrana. A los 11-12 DIV se sometieron los cultivos a OGD/R y a los 30 min de la fase R se procedió a la extracción de proteína utilizando el tampón de extracción del kit de Co-IP sobre hielo para muestra total o a la obtención de muestra de membrana plasmática (apartado 8.2) seguido de extracción de proteína con el tampón del kit para muestra de membrana. Se mantuvieron las muestras 15 min en hielo y se centrifugaron a 2600xg durante 5 min a 4°C. Seguidamente se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo de microcentrífuga para realizar la Co-IP.

El sistema de Dynabeads se basa en la unión covalente del anticuerpo de elección en la superficie de unas bolas magnéticas (Dynabeads) fácilmente separables de la suspensión mediante el uso de un imán (Figura 19). Se utilizó un soporte especial

de Life Technologies para tubos de microcentrífuga que lleva acoplado un imán al cual se denominará “magnet”. Una vez conseguida la unión covalente del anticuerpo a los Dynabeads (complejo Dynabeads-Anticuerpo, Db-Ac), los Db-Ac se utilizaron para inmunoprecipitar y aislar DAPK1 o GIPC y su interactoma del lisado de partida. El sistema de tampones del kit está optimizado para conseguir la captación de complejos de proteínas intactos minimizando las uniones inespecíficas.

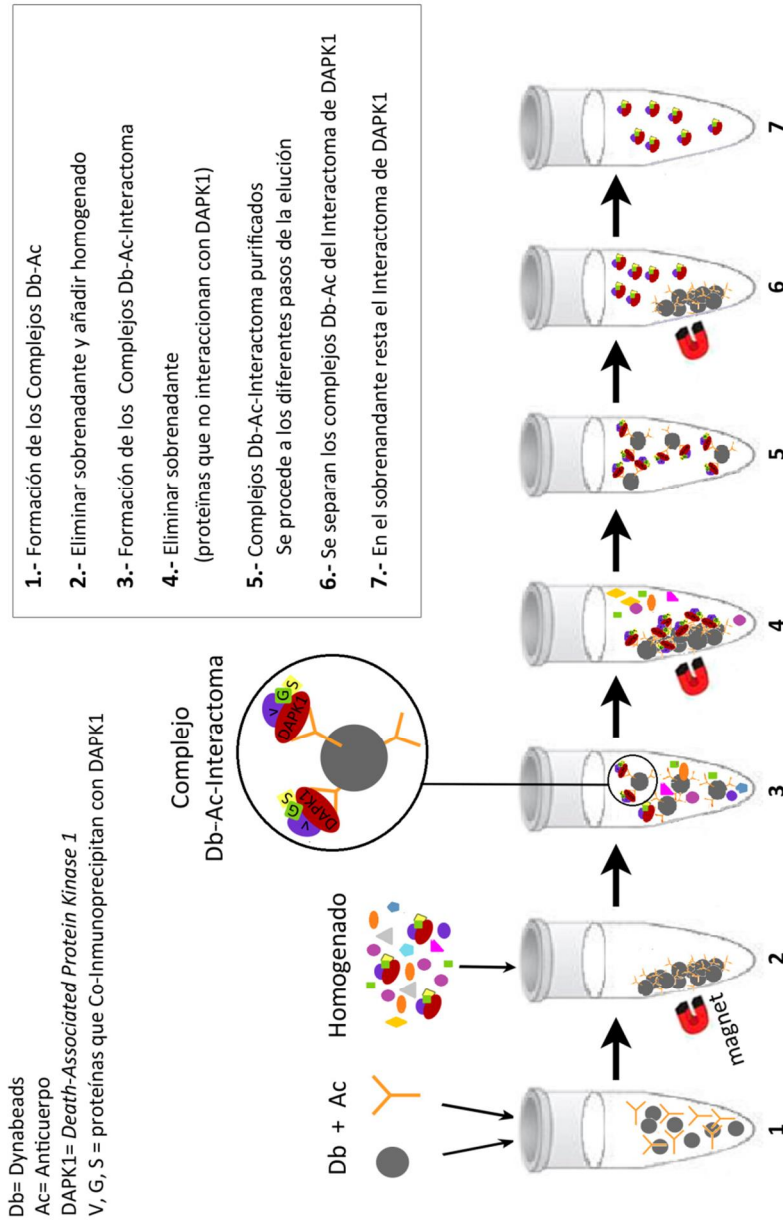


Figura 19 . Esquema del procedimiento de inmunoprecipitación con dynabeads; ejemplo DAPK1. Esquema de los pasos necesarios para realizar la Co-IP-DAPK1 donde observamos que las propiedades magnéticas de los dynabeads nos permiten separar los beads -Ab-proteínas del resto del lisado. El mismo procedimiento se realizó para la obtención del Co-IP-GIPC utilizando anticuerpos específicos anti GIPC.

En base al protocolo recomendado por *Life technologies*, y después de realizar un análisis bibliográfico de la técnica, se mejoraron las condiciones en los diferentes pasos a lo largo del protocolo, sobre todo se comprobó la eficacia de la técnica en cuanto a la concentración del extracto a utilizar, los lavados realizados y las concentraciones necesarias de anticuerpo para cada ensayo.

Unión del anticuerpo anti-DAPK1 o anti-GIPC a los Dynabeads. Formación del complejo Db-Ac

La unión del anticuerpo a los Dynabeads es más eficiente cuando se utilizan bajas concentraciones de anticuerpo por mg de beads. El anticuerpo que se utilizó para realizar las Co-IP fue el anticuerpo rabbit anti-DAPK1 o anticuerpo goat anti-GIPC. Las instrucciones del kit de Co-IP utilizado recomendaban utilizar 5-7 μg de anticuerpo por mg de beads, pero debido a que los anticuerpos utilizados contenían ácido sódico se utilizaron 10 μg de Ab/mg de Dynabeads siguiendo las recomendaciones del kit. Se centrifugó el stock de anticuerpo a 16.000xg durante 10 min a 4°C para eliminar la presencia de agregados que entorpecen la unión a los Dynabeads. Tras seguir exhaustivamente todos los pasos recomendados por Life technologies se consiguió obtener los complejos covalentes Db-Ac.

Co-inmunoprecipitación

Se recuperaron los complejos Db-Ac beads unidos a nuestro anticuerpo, se transfirieron a un tubo de microcentrífuga nuevo, se lavaron con tampón de extracción del kit y se incubaron con el sobrenadante obtenido de la extracción de proteína en un agitador rotativo de rodillos, *roller*, en un recipiente que favorecía la agitación rotatoria durante 1 h a 4°C. Seguidamente se colocaron los tubos en el magnet, se eliminó el sobrenadante y tras varios lavados con los tampones del kit se procedió a la elución de las proteínas de interés, esto es, se separan los complejos Ab-Ac del antígeno DAPK1-interactoma o GIPC-interactoma. Se utilizó el método de elución 1 o 2 en función de la técnica que se quisiese usar

posteriormente para la determinación de las proteínas presentes en la solución de elución (Figura 20):

Método de elución 1: Se resuspendió el 20% de los complejos Db-Ac-proteínas en 60 μ L de tampón de elución del kit y se incubaron en un roller a TA durante 5 min. Se colocó el tubo en el magnet y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Este sobrenadante que contenía la proteína DAPK1 y su interactoma, se utilizó para su posterior determinación mediante western blot.

Método de elución 2: El 70% de los complejos Db-Ac-proteínas se resuspendieron en 1% TCA y se incubaron en un roller durante 20 min a TA. Se transfirió el sobrenadante, que contiene DAPK1 y su interactoma, a un tubo de microcentrífuga nuevo. Se repitió el procedimiento de elución por segunda vez para asegurar la máxima obtención de proteína (esta vez el tiempo de incubación fue de 10 min). El sobrenadante resultante se unió al anterior y esta muestra se utilizó para el análisis proteómico por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

Mediante el método de elución 1, la cantidad de proteína obtenida en los Co-IP-DAPK1 fue de aproximadamente 25 μ g de proteína en muestra total. En el caso de muestras de membrana, la cantidad de proteína obtenida fue mucho menor que en muestra total, 6 μ g de proteína. Por ello se realizó un *pool* de los tres experimentos independientes realizados obteniendo un total de 12 μ g de proteína. Los eluidos obtenidos mediante el método de elución 1 se utilizaron para el análisis por WB (apartado 8.6). Por otro lado, mediante el método de elución 2, se obtuvieron aproximadamente 90 μ g de proteína en muestra total y 18 μ g de proteína en muestra de membrana, que se destinaron a la determinación por LC-MS/MS (apartado 8.7).

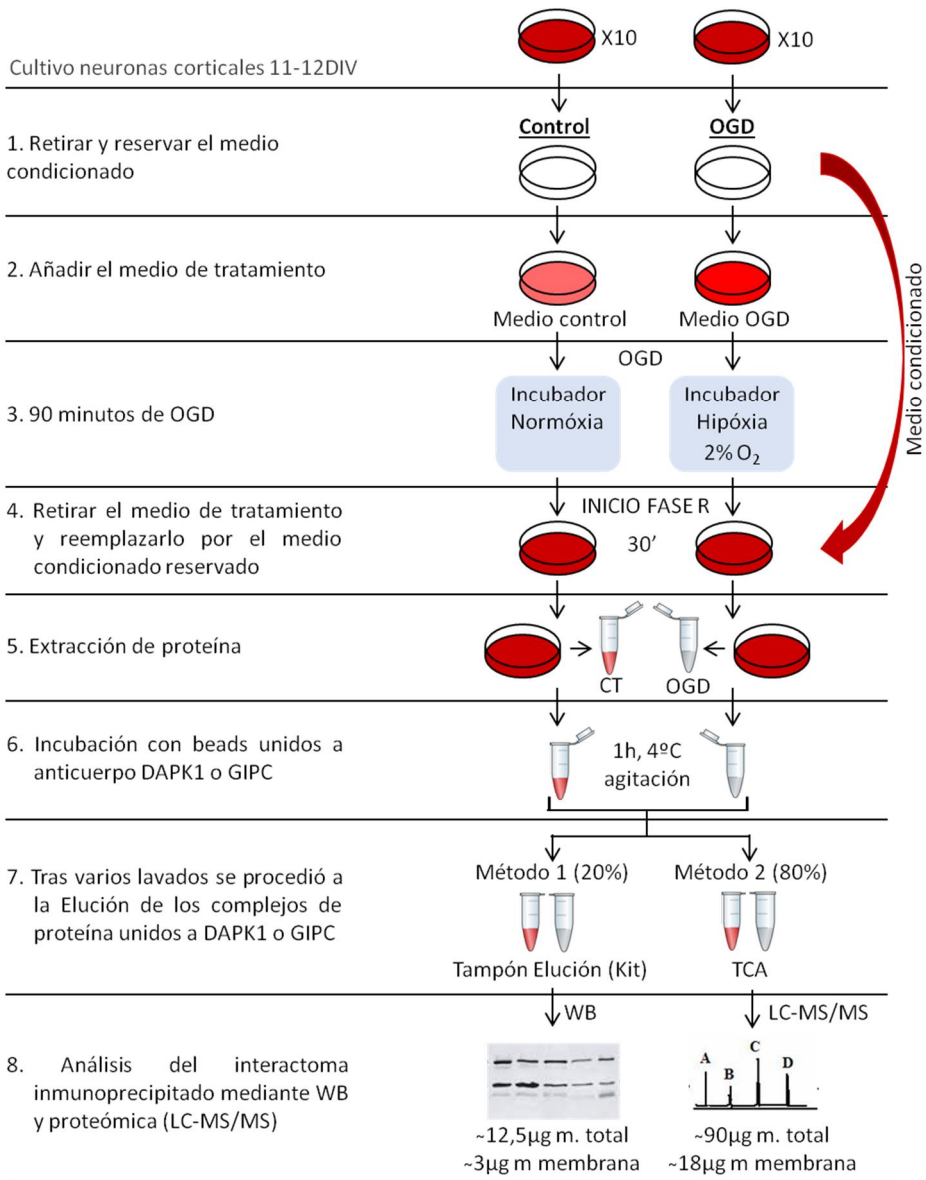


Figura 20. Esquema explicativo del procedimiento de Co-IP con anticuerpo anti-DAPK1 realizado para cada experimento independiente.

8.6. Estudio de DAPK1 y las proteínas co-inmunoprecipitadas mediante WB

Para estudiar los niveles proteicos de las proteínas coimmunoprecipitadas con DAPK1 en condiciones control y OGD, se siguió el protocolo de WB detallado previamente en el apartado 6.5. Se cargó en cada carril el mismo volumen de coimmunoprecipitado con anticuerpo anti-DAPK1 (Co-IP-DAPK1) control u OGD/R (~12.5 µg de proteína de muestra total o ~3 µg de proteína de muestra de membrana). Para determinar los niveles totales de las proteínas NR2B, GIPC y CamKII coimmunoprecipitados con DAPK1, se normalizaron los valores densitométricos de las bandas obtenidas respecto a los valores de DAPK1 total inmunoprecipitada en cada condición. Los anticuerpos específicos utilizados fueron:

Tabla 9. Anticuerpos utilizados en el estudio de la expresión de DAPK1 y proteínas co-inmunoprecipitadas mediante WB

Anticuerpos Primarios	Dilución	Casa comercial
<i>Rabbit Anti-IgG</i>	1:400	Santa Cruz Biotechnology
<i>Mouse anti-Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II (CamkII)</i>	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<i>Mouse anti-NMDAR subunit NR2B</i>	1:100	Millipore
<i>Mouse anti- post synaptic density 95KDa protein (PSD95)</i>	1:100	Sigma-Aldrich
<i>Goat anti-GAIP interacting protein at C terminus (GIPC), Ab D19</i>	1:100	Santa Cruz Biotechnology
<i>Goat anti-GAIP interacting protein at C terminus (GIPC), Ab C20</i>	1:100	Santa Cruz Biotechnology
<i>Rabbit anti-death associated protein kinase 1 (DAPK1)</i>	1:400	Sigma-Aldrich

Anticuerpos Secundarios	Dilución	Casa comercial
<i>IRDye 680 Donkey Anti-mouse</i>	1:15000	Bonsai Advanced Technologies
<i>IRDye 800 Donkey Anti-mouse</i>	1:15000	Bonsai Advanced Technologies
<i>IRDye 680 Donkey Anti-goat</i>	1:15000	Bonsai Advanced Technologies
<i>IRDye 800 Donkey Anti-goat</i>	1:15000	Bonsai Advanced Technologies
<i>IRDye 680 Donkey Anti-rabbit</i>	1:15000	Bonsai Advanced Technologies
<i>IRDye 800 Donkey Anti-rabbit</i>	1:15000	Bonsai Advanced Technologies

8.7. Identificación de proteínas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS)

Para analizar el interactoma de DAPK1 y poder identificar aquellas proteínas que estaban coimmunoprecipitando de forma diferencial en las muestras OGD/R, las muestras obtenidas en los ensayos de Co-IP se analizaron mediante dos estrategias proteómicas (Figura 22).

8.7.1. SDS-PAGE + identificación por MS

En primer lugar se realizó una separación de las proteínas mediante electroforesis en gel SDS-PAGE y los geles se visualizaron con tinción de nitrato de plata. Las bandas diferenciales entre las condiciones Control y OGD se recortaron, se digirieron utilizando tripsina y se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Sin embargo, en dos intentos realizados no fue posible identificar ninguna proteína en las bandas analizadas, ya fuera por contaminación o por posibles incompatibilidades de los geles utilizados. Por ello, y como segunda

estrategia, decidimos analizar las muestras coimmunoprecipitadas sin separación previa, realizando directamente una digestión con tripsina y analizando los péptidos generados mediante cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas.

8.7.2. Cromatografía líquida acoplada a MS (LC-MS/MS)

La espectrometría de masas es una tecnología que permite producir iones en fase gaseosa a partir de moléculas orgánicas o inorgánicas, clasificarlos en función de su relación masa-carga (m/z) y medir su intensidad. Mediante esta técnica se puede determinar el peso molecular y la abundancia de los componentes de una mezcla. Los iones analizados pueden corresponder a moléculas enteras, aductos o fragmentos de moléculas. Un espectrómetro de masas está formado por una fuente de iones, un analizador y un detector. Las muestras a analizar se introducen en la fuente de iones donde los componentes de la muestra son convertidos en iones en fase gaseosa. Estos iones son transferidos al analizador donde son acelerados y separados según su relación m/z utilizando diferentes principios físicos según el tipo de analizador. Los analizadores se clasifican en cuatro grupos: de sectores (eléctricos y/o magnéticos), de cuadrupolo (Q), de tiempo de vuelo (TOF, *time of flying*) y de atrapamiento de iones (analizadores de resonancia ciclotrónica (ICR, *ion cyclotron resonance*) y trampas iónicas (IT, *ion trap*)).

La determinación de las proteínas por espectrometría de masas (LC-MC/MC) se realizó en el laboratorio de proteómica CSIC/UAB dirigido por el Dr. Joaquín Abián y bajo la supervisión de la Dra. Montserrat Carrascal.

Preparación de la muestra para LC-MS/MS

Se partió de muestras equivalentes derivadas de 2 experimentos/cultivos diferentes en las que la mitad del cultivo se trató como control y la otra mitad se expuso a OGD/R. Para cada cultivo/experimento obtuvimos aproximadamente 70-

90 µg de proteína tanto en la muestra total control como la expuesta a OGD/R. Por otro lado, en las muestras de membrana, la cantidad de proteína obtenida fue muy inferior y se realizó un pool a partir de 3 experimentos/cultivos distintos para cada condición; consiguiendo así aproximadamente 18 µg de proteína control y 18 µg de proteína en la muestra OGD/R. Las muestras fueron digeridas utilizando FASP (Wisniewski et al., 2009) y tripsina como enzima, siguiendo los protocolos internos del LP-CSIC/UAB.

LC-MS/MS de baja resolución

Cada uno de los replicados obtenidos en la Co-IP-antiDAPK1 de extractos de proteína total y de proteínas de membrana fue analizado mediante LC-MS/MS de baja resolución en modo dependiente de datos. Para ello se utilizó un espectrómetro de masas de trampa iónica lineal LTQ-Velos (ThermoFisher) acoplado a un cromatógrafo de líquidos capilar. Las muestras se inyectaron en un sistema cromatográfico equipado con una columna de preconcentración C18 (300 µm id x 0,5 cm) y una columna analítica (150 µm id x 15 cm). Los péptidos se cargaron en la columna de preconcentración utilizando 1% ácido fórmico (AF) como solvente y se eluyeron directamente a la columna analítica con un flujo de 1µl/min utilizándose un gradiente de 0-40% acetonitrilo (ACN) (0.1% AF) en 120 min. El sistema cromatográfico se conectó on-line al espectrómetro de masas realizándose el análisis en modo de barridos dependientes: un barrido completo y 10 barridos paralelos de MS/MS sobre los precursores más abundantes. Se incluyó un tiempo de exclusión de 25 segundos para evitar análisis repetitivos de señales dominantes.

LC-MS/MS de alta resolución

Los inmunoprecipitados de muestra total obtenidos de la inmunoprecipitación con anticuerpo anti-DAPK1 también fueron analizados mediante LC-MS/MS de alta resolución. Se analizaron 2 inmunoprecipitados independientes para cada condición estudiada, control y OGD.

Las muestras se inyectaron en un sistema cromatográfico equipado con una columna de preconcentración C18 (300 μm id x 0,5 cm) y una columna analítica (150 μm id x 15cm). Los péptidos se cargaron en la columna de preconcentración utilizando 1% AF como solvente y se eluyeron directamente a la columna analítica con un flujo de 400nl/min utilizándose un gradiente de 0-40% ACN (0.1% FA) en 120 min. El sistema cromatográfico se conectó on-line a un espectrómetro de masas de alta resolución LTQ-Orbitrap XL (ThermoFisher) realizándose el análisis en modo de barridos dependientes: un barrido completo utilizando el Orbitrap con una resolución de 60.000 y 10 barridos paralelos de MS/MS en la trampa iónica sobre los precursores más abundantes. Se incluyó un tiempo de exclusión de 30 segundos para evitar análisis repetitivos de señales dominantes.

8.7.3. Búsqueda en bases de datos e identificación de péptidos

La identificación de los péptidos en base de datos se realizó mediante el software *Proteome Discoverer V1.4* (Thermo-Instruments) utilizando la base de datos Uniprot 2015-10 restringida a roedores y los siguientes parámetros: tolerancia de masa de péptido 2 Da y 20 ppm para baja y alta resolución, respectivamente, tolerancia de fragmentos de 0,8 Da, enzima tripsina, permitiendo hasta 2 uniones perdidas, modificación dinámica de oxidación de metionina (+16 Da) y modificación fija de carbamidometilación de cisteína (+57 Da). Las identificaciones se filtraron al 1% y 0,1% de FDR para baja y alta resolución, respectivamente, y únicamente se consideraron proteínas identificadas con dos o más péptidos. La siguiente imagen (Figura 21) muestra un ejemplo de la información resultante.

Accession	Description	ΣCoverage	Σ# Proteins	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs
Q6GMN8	Actn1 protein OS=Rattus norvegicus GN=Actn1 PE=	16,46	7	1	13	40
P08413	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II	39,48	10	8	15	159
P62944	AP-2 complex subunit beta OS=Rattus norvegicus G	20,92	10	17	17	33

Continuación

Score CT	Coverage CT	# Peptides CT	# PSM CT	Score OGD	Coverage OGD	# Peptides OGD	# PSM OGD	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
71,96	14,99	12	31	18,04	9,02	7	9	887	102,5	5,48
200,46	33,21	12	68	281,27	39,48	15	91	542	60,4	7,17
62,24	17,18	14	20	26,45	10,25	9	13	937	104,5	5,38

Figura 21. Imagen de una sección de la tabla que contiene la información proporcionada por el software Proteome Discoverer v1.4 de uno de los experimentos de inmunoprecipitación que se analizaron por LC-MS/MS de alta resolución. En la tabla, CT corresponde a la condición control y OGD corresponde a la condición OGD/R.

8.7.4. Cálculo del valor de FoldChange

Con objeto de determinar posibles candidatos diferenciales entre ambas muestras, se utilizaron los parámetros score, PSM y coverage proporcionados por el software de búsqueda *Proteome Discoverer v1.4*. Por un lado se tuvo en cuenta el parámetro "Score" generado por el software y adicionalmente también se calculó el producto (PSM*Coverage), siendo PSM el total de espectros identificados y coverage el recubrimiento de secuencia en porcentaje de la proteína en cuestión. Para cada proteína identificada y, dentro de un mismo experimento, se calculó el *ratio* de (Score OGD / Score Control) y también el *ratio* (PSM*Coverage OGD/ PSM*Coverage control). En muestra total, se realizaron estos cálculos de forma independiente en cada una de las LC-MS/MS realizadas (baja y alta resolución). Aquellas muestras en las que estos *ratios* estaban alteradas más de 2,5 veces en los 2 experimentos analizados se consideraron proteínas con un posible incremento en el Co-IP-DAPK1 tras la OGD/R. Estas proteínas se seleccionaron y listaron en las tablas de resultados como posibles candidatos a ser estudiados (Tabla 9). De forma análoga los *ratios* inversos, (Score control / Score OGD) y (PSM*Coverage control/ PSM*Coverage OGD), que se mostraron alterados más de 2,5 veces en los 2 experimentos se consideraron proteínas con una posible disminución en el Co-IP-DAPK1 tras la OGD/R (Tabla 10). El mismo procedimiento se utilizó para comparar los datos obtenidos en la LC-MS/MS de baja resolución de muestras de membrana (Tablas 11 y 12). En todos los casos se mostró en las tablas de proteínas identificadas el valor del *ratio* obtenido mediante el Score (Tablas 9-12).

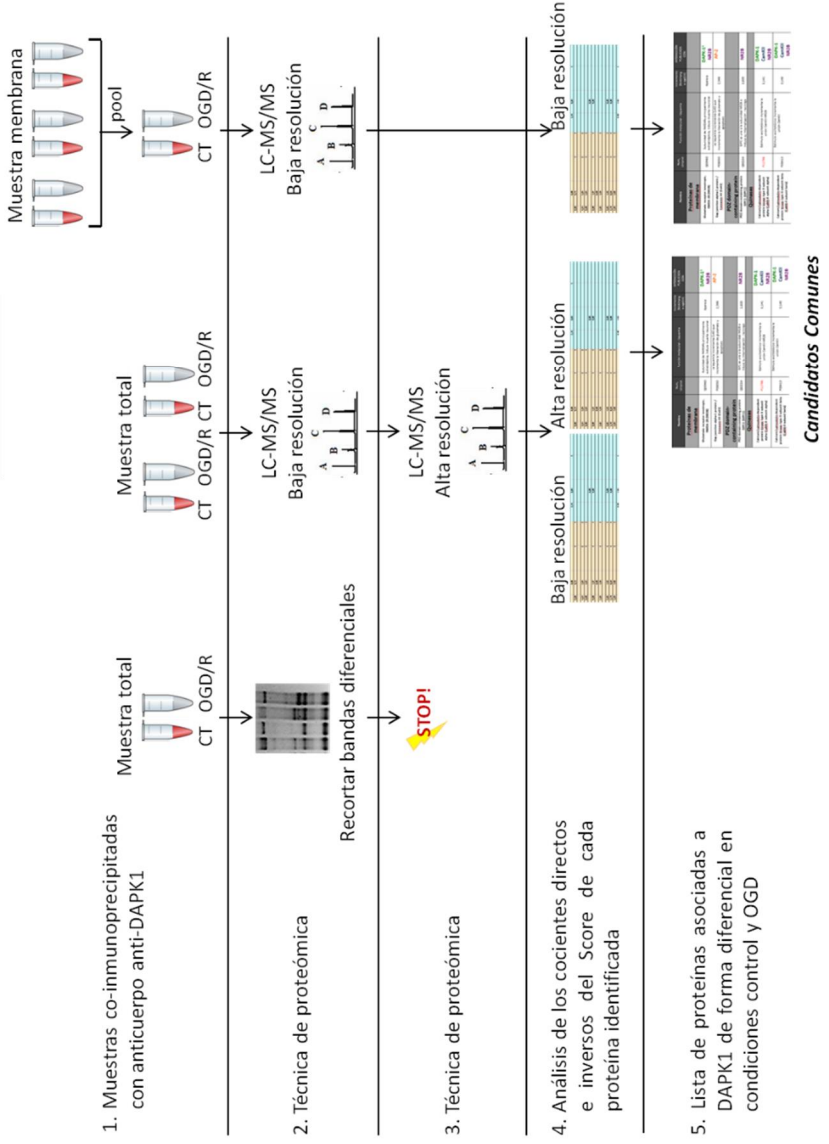


Figura 22. Esquema explicativo de los ensayos de proteómica realizados a partir de las muestras obtenidas de la Co-IP-DAPK1. La primera estrategia consistente en la identificación de proteínas a partir de un gel SDS-PAGE no generó resultados. En cambio, el análisis de los Co-IP por LC-MS/MS generó una lista de proteínas identificadas en el interactoma de DAPK1. Para muestra total realizamos dos experimentos independientes que se analizaron por LC-MS/MS de baja y alta resolución. Para muestra de membrana realizamos un pool de las muestras control y otro de las muestras OGD obtenidas en tres experimentos independientes y se analizaron por LC-MS/MS de baja resolución.

RESULTADOS

9. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO Y MODELO

9.1. Caracterización de los cultivos primarios de neuronas corticales

Los estudios de esta tesis doctoral se realizaron en cultivos de neuronas corticales debido a que son las células que inician programas de muerte en los modelos animales de ictus transitorio (Baron, 2005, Hughes et al., 2010, Ejaz et al., 2013). Previamente a la realización de los experimentos, se procedió a la caracterización de nuestros cultivos primarios de neuronas corticales de 11 -12 días en cultivo (DIV, *days in vitro*). Para ello se utilizó un marcador de neuronas (MAP2), un marcador de astrocitos (GFAP) así como marcaje de todos los núcleos celulares presentes (Hoechst). Tras el conteaje se determinó que entre un 1-3% de células expresaban el marcador glial GFAP en los distintos cultivos y el resto expresaba el marcador neuronal MAP2 (Figura 23), lo que indica que se ha trabajado con cultivos puros de neuronas corticales (97-99%). No se observó inmunoreactividad para microglia. Este dato coincide con lo descrito por otros autores para cultivos de neuronas corticales cultivadas en presencia del suplemento B-27, suplemento utilizado en nuestros cultivos (Fordyce et al., 2005).

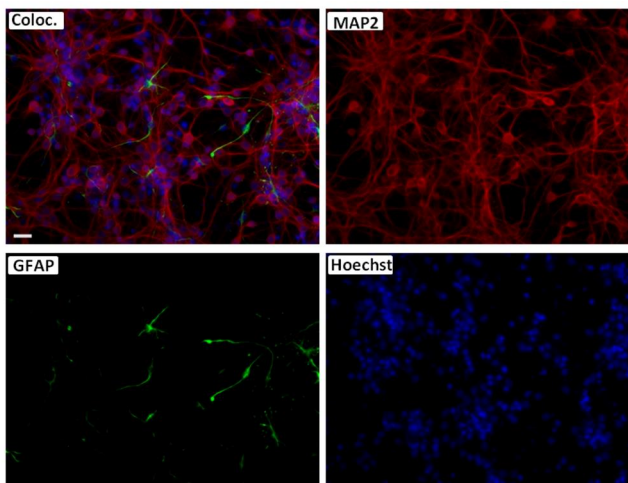


Figura 23. Caracterización de cultivos primarios de neuronas corticales de 12 DIV. Imágenes representativas de neuronas corticales en cultivo en condiciones control mostrando en rojo el marcador neuronal MAP2, en verde el marcador de astrocitos GFAP y en azul el núcleo neuronal. Barra de tamaño: 20 μ m.

La mayoría de las neuronas presentes en los cultivos primarios de neuronas corticales son neuronas piramidales excitadoras aunque intercaladas entre estas, se suelen hallar neuronas GABAérgicas inhibitoras (Hayashi et al., 2003a). El balance entre señal glutamatérgica excitadora e inhibición por GABA es crucial para el correcto desarrollo y supervivencia de las neuronas, y condiciona la muerte por exceso de glutamato o muerte excitotóxica. Con el objetivo de determinar el porcentaje de neuronas GABAérgicas presentes en nuestros cultivos, se utilizó un anticuerpo específico que reconoce las dos isoformas de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD; *glutamate descarboxylase*); GAD65 y GAD67. GAD es una de las enzimas limitantes en la síntesis de GABA y se utiliza como marcador de interneuronas inhibitoras; GAD65 se encuentra en los terminales nerviosos y sinapsis sintetizando GABA para la neurotransmisión sináptica mientras que GAD67 está distribuida por toda la célula sintetizando GABA para la actividad neuronal no relacionada con neurotransmisión, como sinaptogénesis o protección contra el daño neuronal (Pinal and Tobin, 1998). Se determinó que, en nuestros cultivos, el 20% de las neuronas corticales eran positivas para GAD (GAD+) y correspondían a neuronas con núcleos y cuerpos celulares grandes (>10 μm) comparados con el resto de neuronas (Figura 24).

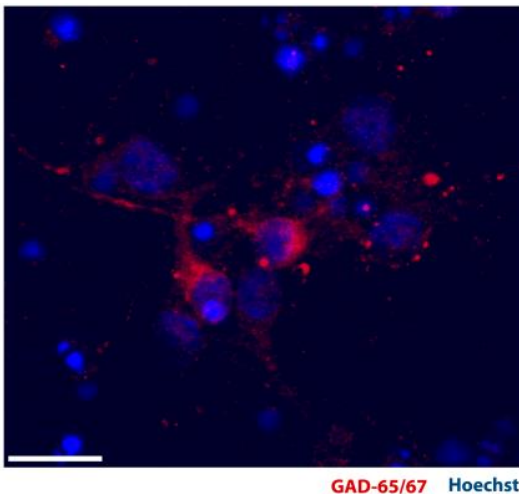


Figura 24. Neuronas GABAérgicas presentes en cultivos primarios de neuronas corticales de 12 DIV en condiciones control. Imágen representativa en condiciones control mostrando en rojo GAD65/67 y en azul el núcleo neuronal (Hoechst). Barra de tamaño: 20 μm .

Las neuronas de 11-12 DIV son consideradas neuronas maduras y expresan receptores de glutamato (Sans et al., 2000; Lesuisse and Martin, 2002). Ya a 7 DIV las neuronas corticales expresan todas las subunidades de NMDARs en cuerpo celular y dendritas y tienen correctamente desarrolladas las vías de señalización que median las señales excitotóxicas a través de los NMDARs (Sans et al., 2000; Lesuisse and Martin, 2002; Leveille et al., 2008). Aunque a 7 DIV las neuronas ya presentan NMDARs activos, decidimos realizar los experimentos a 11-12 DIV debido a que a entre 7-14 DIV aún se produce un incremento en la formación de sinapsis (Lesuisse and Martin, 2002; Leveille et al., 2008). Se comprobó mediante el marcaje fluorescente de las subunidades NR2B y NR2A que, efectivamente, nuestros cultivos de 11-12 DIV expresaban NMDARs (Figura 25), independientemente del tamaño de la neurona.

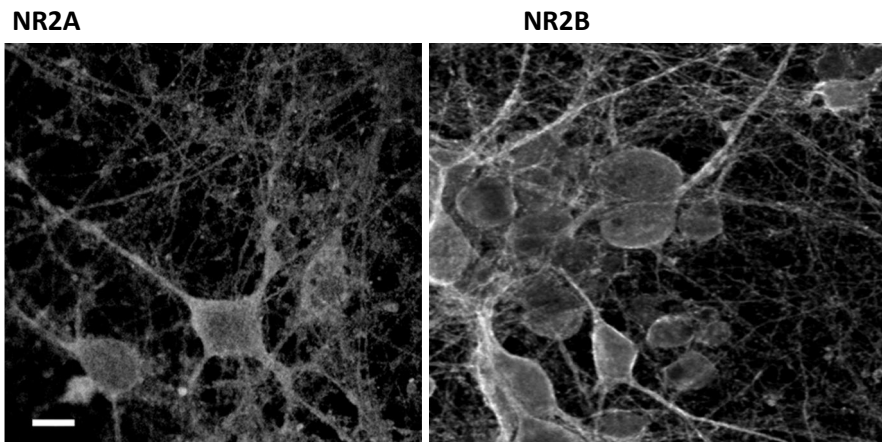


Figura 25. Expresión de las subunidades NR2A y NR2B en cultivos primarios de neuronas corticales de 12 DIV en condiciones control. Imágenes representativas en condiciones control mostrando la subunidad NR2A (izquierda) o NR2B (derecha). Barra de tamaño: 10 μ m.

9.2. Caracterización del modelo de isquemia *in vitro*

El modelo de isquemia *in vitro* utilizado para la realización de esta tesis consiste en someter los cultivos primarios de neuronas corticales a privación de oxígeno y glucosa (OGD, *oxygen and glucose deprivation*), para mimetizar lo que ocurre en

el territorio cerebral afectado durante la oclusión de una arteria. Para ello, se utilizó un sistema de OGD+reoxigenación+reintroducción de glucosa (OGD/R: OGD + fase R) porque la isquemia focal transitoria es el tipo de infarto cerebral más frecuente en humanos [Gascón et al., 2008] y hasta el momento la recanalización temprana es la mejor forma de prevenir el daño.

9.2.1. Establecimiento del curso temporal de la muerte neuronal inducida por OGD/R

En condiciones normales, las neuronas se cultivan en un medio de cultivo que contiene 4,5 mg/mL de glucosa y expuestas a una atmósfera con una presión parcial de oxígeno del 21%. El objetivo del presente estudio era establecer un modelo de isquemia *in vitro* que simulara el daño neuronal que se produce en la zona de penumbra de una lesión isquémica, donde encontramos neuronas que son potencialmente salvables una vez que se restablece la normoxia/normoglucemia. Se analizó el curso temporal de la muerte inducida por este modelo y se observó que en los primeros 15 minutos de la fase R no se producía muerte neuronal significativa, pero sí tras 1 hora de fase R (Figura 26).

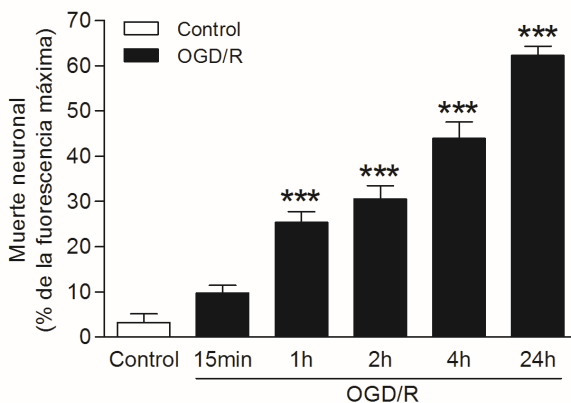


Figura 26. Muerte neuronal inducida por OGD/R en cultivos de neuronas corticales de 12 DIV. Gráfico que muestra el curso temporal de la muerte inducida por OGD durante la fase R. *** $p < 0,001$ respecto al control. $n=5$ experimentos independientes (12 pocillos por condición y experimento).

En base a este curso temporal, se realizaron los posibles tratamientos neuroprotectores y el estudio proteómico dentro de la primera hora de la fase R, en la que no se produce muerte neuronal elevada.

9.2.2. Determinación del componente glutamatérgico-excitotóxico

Para determinar el componente excitotóxico del modelo de OGD/R utilizado, se sometieron cultivos de neuronas corticales de 12 DIV a 90 min de OGD tras los cuales se añadió MK801 al medio de R. MK801 es un antagonista no competitivo de los NMDARs que solamente bloquea los NMDARs activados (cuando el canal iónico está abierto) (Wong et al., 1986; Bender et al., 2006). A las 24 h de R se observó que la administración de 10 μ M MK801 al inicio de la fase de R bloqueaba totalmente la muerte producida por OGD/R. Este resultado indica que la muerte inducida por nuestro modelo de OGD/R es excitotóxica, es decir, mediada por glutamato a través de los NMDARs. Además, la administración de un antagonista de los receptores AMPA y kainato, 40 μ M CNQX, no mostró efecto neuroprotector frente al daño inducido por OGD/R, confirmando así que la muerte inducida por nuestro modelo OGD/R no está mediada por receptores AMPA ni kainato sino a través de los NMDARs (Figura 27).

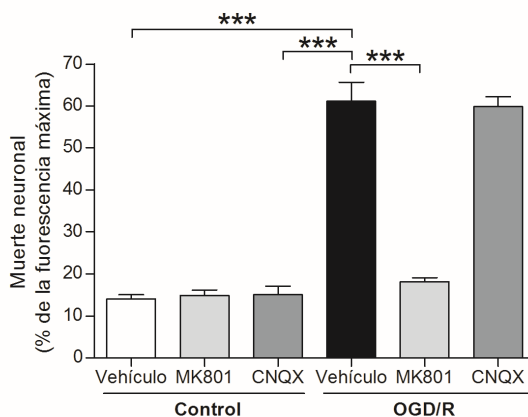


Figura 27. Efecto de la inhibición de los receptores de glutamato ionotrópicos sobre la muerte neuronal inducida por OGD/R en cultivos de neuronas corticales de 12 DIV. Gráfico que muestra el efecto de la administración de 10 μ M MK801 o 40 μ M CNQX al inicio de la fase R sobre la muerte neuronal inducida por OGD/R determinada a las 24 h de fase R. *** p<0,001. n=3 experimentos independientes (>9 pocillos por condición y experimento).

10. RESULTADOS PARTE 1: Intervención sobre NMDARs sinápticos

Varios estudios de acondicionamiento, tratamientos que se inician horas o días antes de que se inicie la isquemia, relacionan el incremento de la fosforilación/activación de CREB mediada por activación de NMDARs sinápticos con protección frente al daño isquémico (Chandler et al., 2001; Papadia et al., 2005). Debido a la impredecibilidad del evento isquémico, esta vía de intervención únicamente tiene potencial terapéutico si es efectivo una vez se ha producido el evento isquémico. Por ello se decidió estudiar si la intervención sobre NMDARs sinápticos y su señalización a través de CREB era neuroprotector también tras el evento isquémico.

10.1. Estudio del efecto de la activación de NMDARs sinápticos/CREB al inicio de la fase R sobre neuroprotección

10.1.1. Caracterización de los protocolos de activación de NMDARs sinápticos y CREB en cultivos de neuronas corticales en condiciones control

En primer lugar se estudió el potencial de los dos protocolos (Syn1 y Syn2) utilizados para activar selectivamente NMDARs sinápticos sobre los niveles y la fosforilación de CREB en nuestros cultivos de neuronas corticales en condiciones control. El análisis realizado por western blot (WB) determinó que los niveles de CREB no varían con la activación de los NMDARs sinápticos, aunque sí incrementan los niveles de CREB fosforilado (pCREB), correspondiente a la forma activa (Figura 28B, C). Los ensayos de inmunocitofluorescencia (ICF) aportaron información sobre el subtipo celular implicado en este proceso, indicando que con tan solo 10 min de activación de los NMDARs sinápticos se produce un incremento de la fosforilación de CREB, tanto en neuronas piramidales excitadoras (<10 μm de diámetro) como en neuronas de subtipo GABAérgico (>10 μm de diámetro) (Figura 28D, E). Ambos protocolos de activación de NMDARs

sinápticos utilizados incrementaron significativamente los niveles de pCREB (Figura 28).

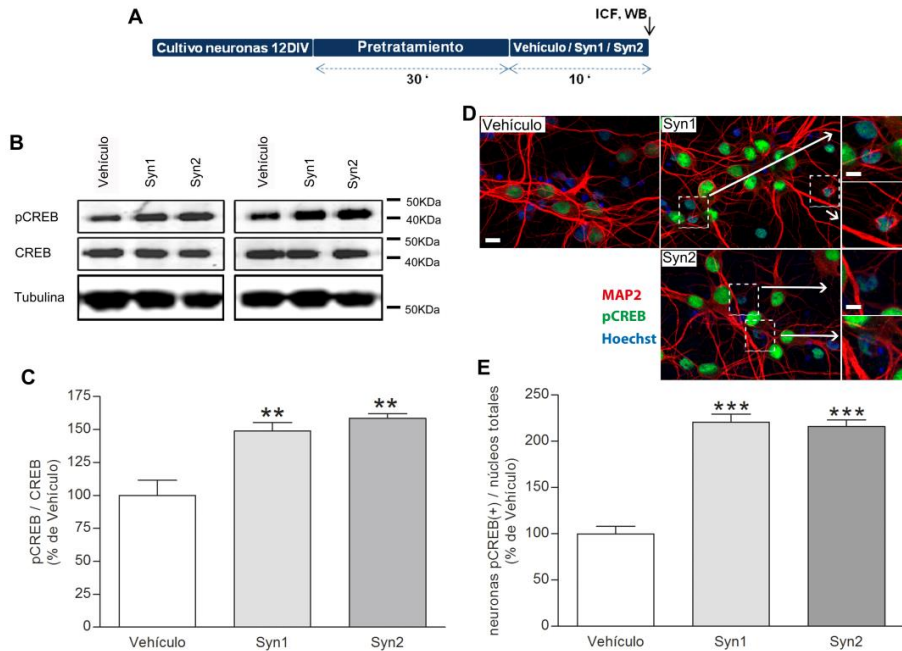


Figura 28. Efecto de la activación selectiva de NMDARs sinápticos sobre los niveles de pCREB en cultivos de neuronas corticales de 12 DIV en condiciones control. **A)** Esquema de la línea temporal de tratamiento realizado. **B)** WB representativos de pCREB y CREB en las tres condiciones de estudio (Vehículo, Syn1 o Syn2). **C)** Gráfico que muestra la relación pCREB/CREB obtenida por WB. **D)** Imágenes representativas de las tres condiciones de estudio mostrando en rojo el marcador neuronal MAP2, en verde pCREB y en azul el núcleo neuronal. En las ampliaciones se muestran neuronas de $<10 \mu\text{m}$ que expresan pCREB. **E)** Gráfico que muestra el porcentaje de neuronas que expresan pCREB respecto al total de núcleos. Barra de tamaño: $10 \mu\text{m}$, excepto en las ampliaciones donde corresponde a $5 \mu\text{m}$. ** $p < 0,01$ respecto al vehículo; *** $p < 0,001$ respecto al vehículo. $n=3$ experimentos independientes (6 réplicas por condición y experimento para WB y 10 campos por condición y experimento para ICF).

10.1.2. Efecto de la activación de NMDARs sinápticos/CREB al inicio de la fase R sobre los niveles de pCREB y la muerte neuronal inducida por OGD/R

Una vez determinado que la activación de NMDARs sinápticos inducía un incremento rápido de pCREB en cultivos de neuronas corticales control, se estudió el efecto de la activación de los NMDARs sinápticos sobre pCREB en cultivos

sometidos a OGD/R. Se observó que la OGD/R reduce los niveles de pCREB y el número de neuronas positivas para pCREB (Figura 29C y E). Se determinó que la activación de los NMDARs sinápticos es efectiva también tras el periodo de OGD, tanto con el modelo Syn1 como Syn2, doblando el ratio pCREB/CREB (Figura 29B-C) y triplicando el número de neuronas que expresan pCREB (Figura 29D-E). Además, se determinó que el incremento de expresión de pCREB tiene lugar en los dos subtipos neuronales de nuestros cultivos (Figura 29D).

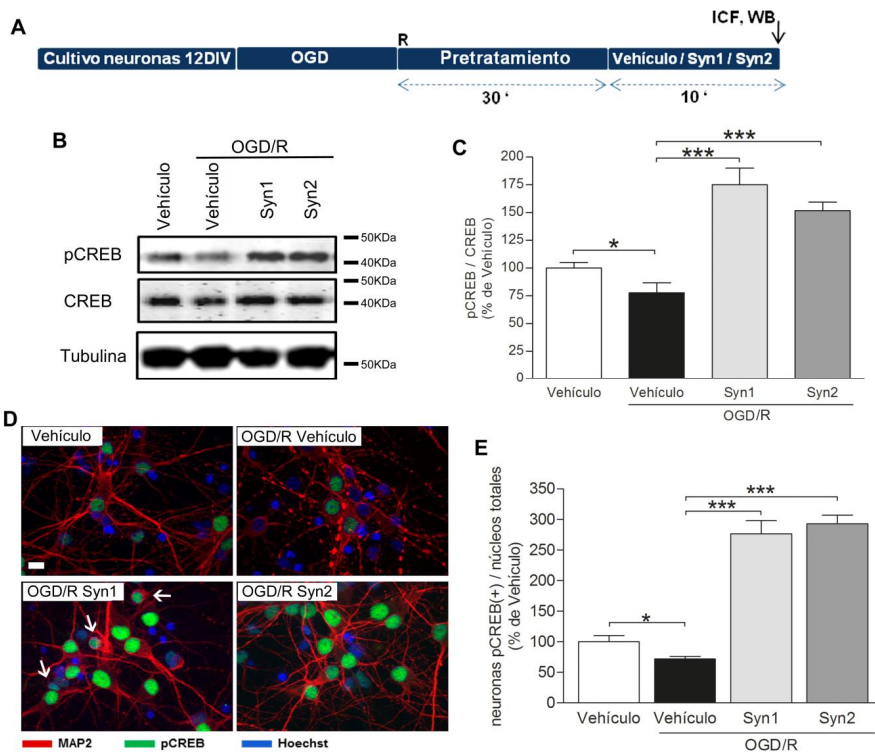


Figura 29. Efecto de la activación de NMDARs sinápticos al inicio de la fase R en cultivos de neuronas corticales de 12 DIV sometidos a OGD/R. **A)** Esquema de la línea temporal. **B)** WB representativos de pCREB y CREB en las cuatro condiciones de estudio (Vehículo, Vehículo/OGD, Syn1/OGD o Syn2/OGD). **C)** Gráfico mostrando la relación pCREB/CREB analizada a partir de WB. **D)** Imágenes representativas de las cuatro condiciones de estudio mostrando en rojo el marcador neuronal MAP2, en verde pCREB y en azul el núcleo neuronal. Las flechas señalan neuronas piramidales (<10 μm) que expresan pCREB. **E)** Gráfico que muestra el porcentaje de neuronas que expresan pCREB respecto al total de núcleos. *Barra de tamaño: 10 μm .* * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. $n = 3$ experimentos independientes (6 réplicas por condición y experimento para WB y 10 campos por condición y experimento para ICF).

Seguidamente se estudió si la activación de CREB mediada por la activación de NMDARs sinápticos al inicio de la fase R se traduce en la protección de las neuronas corticales en cultivo frente a la muerte inducida por OGD/R. Se demostró que la activación de NMDARs sinápticos al inicio de la fase R protege a las neuronas corticales frente a la muerte exitotóxica. Ambos protocolos de activación de NMDARs sinápticos mostraron un efecto neuroprotector similar (Figura 30).

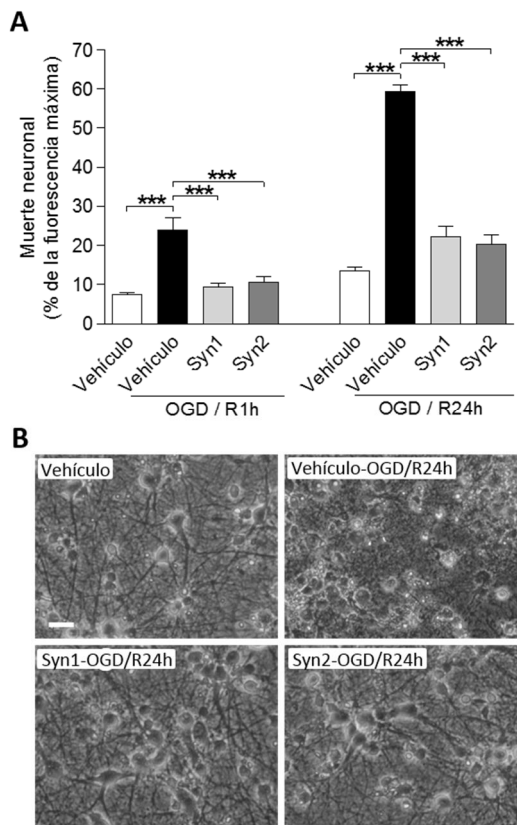


Figura 30. Efecto de la activación de NMDARs sinápticos al inicio de la fase R sobre la muerte neuronal inducida por OGD/R. A) Gráfico mostrando la muerte neuronal a 1 h y 24 h de la fase R en todas las condiciones de estudio (Vehículo, Vehículo/OGD, Syn1/OGD o Syn2/OGD). **B)** Imágenes representativas a las 24 h de la fase R de cultivos primarios de neuronas corticales tras la activación de NMDARs sinápticos al inicio de R. *Barra de tamaño: 20 μ m.* *** $p < 0,001$. $n = 3$ experimentos independientes (12 determinaciones por condición y experimento).

Los resultados obtenidos sugieren que la activación de pCREB tras un evento isquémico *in vitro* podría ser protectora frente a la muerte excitotóxica inducida por OGD/R en los dos subtipos neuronales presentes en nuestros cultivos de neuronas corticales.

10.2. Establecer un posible tratamiento farmacológico aplicable a la clínica que actúe sobre CREB

Se ha descrito que algunas estatinas actúan sobre los niveles de CREB o sobre la actividad de proteínas quinasas reguladoras de CREB (Bell and Yellon, 2003; Prinz et al., 2008; Prakash et al., 2011). Por otro lado, los resultados obtenidos (Figuras 29 y 30) mostraron que la fosforilación de CREB mediada por la activación de NMDARs sinápticos tras la OGD/R es protectora frente a la muerte excitotóxica. Con estos antecedentes se decidió estudiar si el tratamiento con atorvastatina (ATV) o su principal metabolito *in vivo* (o-ATV) al inicio de la fase R inducía un incremento de pCREB y si presentaba efectos neuroprotectores en cultivos de neuronas corticales sometidas a OGD/R.

10.2.1. Efecto del tratamiento con ATV u o-ATV al inicio de la fase R sobre pCREB en cultivos neuronales sometidos a OGD/R

Se expusieron cultivos neuronales de 12 DIV a OGD/R y se administraron 600 nM de ATV u o-ATV al inicio de la fase R. A 1 h del inicio de la fase R se analizó, mediante ICF, el efecto de estos compuestos sobre la intensidad de pCREB. La OGD/R1h provocó una reducción de los niveles de pCREB respecto a los cultivos control. Se determinó que el tratamiento con o-ATV, pero no ATV, al inicio de la fase R incrementa los niveles de pCREB, tanto en condiciones control como OGD/R (Figura 31).

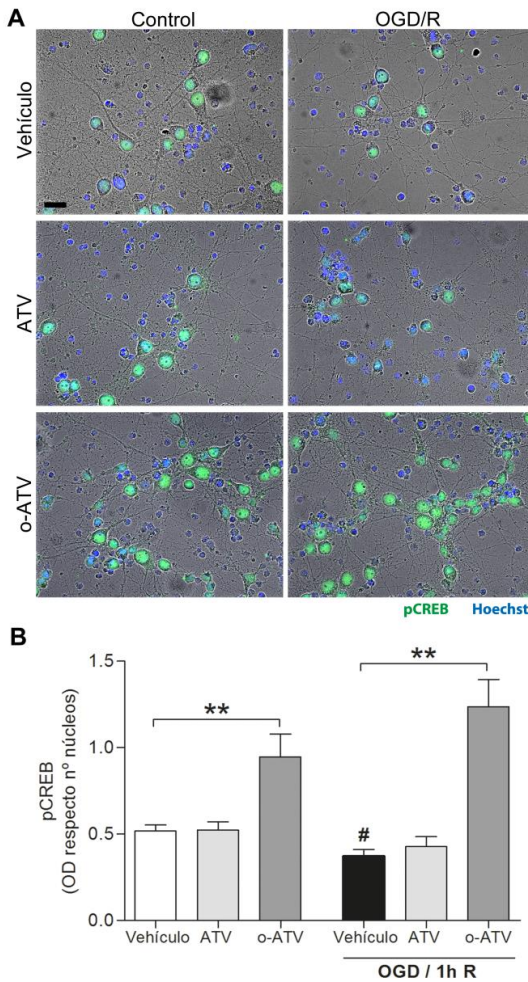


Figura 31. Efecto del tratamiento con ATV u o-ATV al inicio de la fase R sobre pCREB. A) Imágenes representativas en situaciones control u OGD/R de cultivos de neuronas corticales tratados con vehículo, 600 nM ATV o 600 nM o-ATV. **B)** Gráfico que muestra la cuantificación de los niveles de fluorescencia de pCREB (OD, *optical density*) respecto el número de núcleos tras 1 hora de R en cultivos control o sometidos a OGD/R y tratados con vehículo, 600 nM de ATV o 600 nM de o-ATV. *Barra de tamaño: 20 μm.* * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; # $p < 0,05$ respecto al vehículo. $n = 3$ experimentos independientes (10 campos por condición y experimento).

En las imágenes obtenidas por ICF en los experimentos anteriores se observó que, tanto en situación control como OGD/R, la mayor parte de las neuronas que expresaban pCREB correspondían a las neuronas de mayor tamaño del cultivo ($>10 \mu\text{m}$) (Figura 28, 29 y 31) que, según la caracterización realizada anteriormente (apartado 9.1), correspondían a neuronas GABAérgicas. Además, las imágenes sugerían que el efecto de o-ATV incrementando los niveles de pCREB se producía únicamente en este tipo neuronal. En base a estos resultados, el siguiente paso fue el estudio del efecto de o-ATV sobre pCREB en la población de neuronas GABAérgicas. Observamos que, en cultivos neuronales control

aproximadamente el 50% de las neuronas GABAérgicas expresaban pCREB (Figura 32).

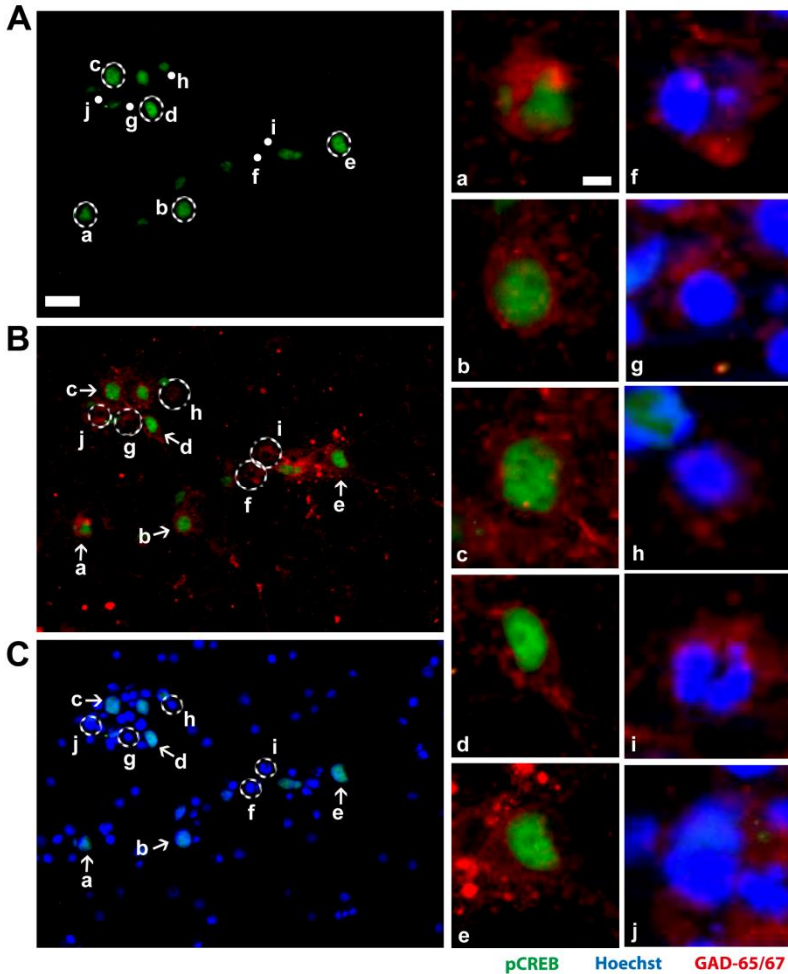


Figura 32. Expresión de pCREB en las neuronas GABAérgicas presentes en los cultivos de neuronas corticales control. Imágenes representativas de cultivos de neuronas corticales control que muestran pCREB en verde (A), pCREB en verde colocalizando con neuronas GAD(+) en rojo (B) y pCREB en verde colocalizando con los núcleos en azul (C). Observamos que en cultivos neuronales control, la mitad de las neuronas positivas para GAD65/67 expresan también pCREB (ver ejemplos a-e), mientras que la mitad restante es negativa (ver ejemplos f-j). Barra de tamaño: 20 μm , excepto en las ampliaciones donde corresponde a 5 μm .

Seguidamente se sometieron los cultivos de neuronas corticales a OGD/R, se administraron 600 nM o-ATV al inicio de la fase R y se determinó el efecto de

o-ATV sobre el porcentaje de neuronas GABAérgicas que expresaban pCREB tras 1 h de R (Figura 33).

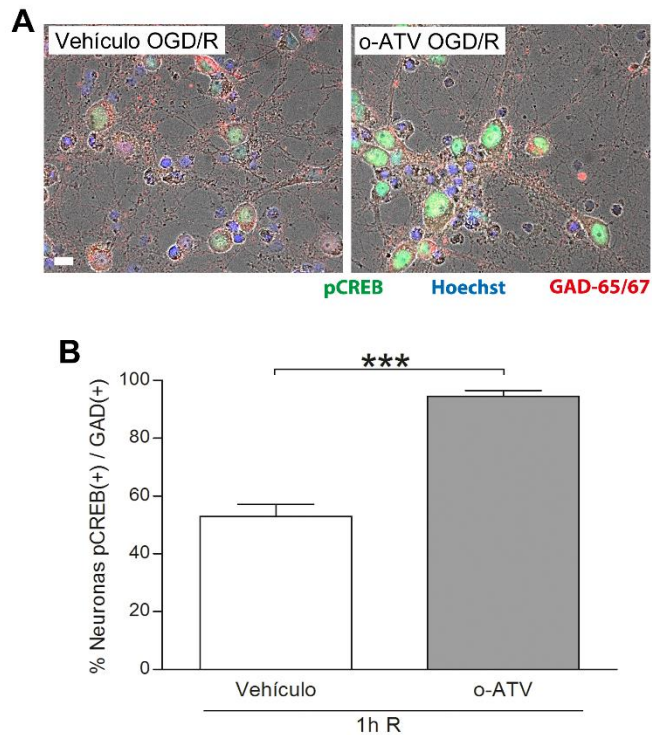


Figura 33. Efecto del tratamiento con o-ATV al inicio de la fase R sobre pCREB en las neuronas GABAérgicas del cultivo sometido a OGD/R. A) Imágenes representativas de cultivos de neuronas corticales sometidos a OGD/R1h tratadas con Vehículo o 600 nM o-ATV al inicio de la fase R, que muestran pCREB en verde colocalizando con los núcleos en azul y las neuronas GAD(+) en rojo. B) Gráfico que muestra el porcentaje de neuronas GAD(+) que expresan pCREB tras 1 h de R en condiciones de OGD/R + vehículo u OGD/R + 600 nM o-ATV. Barra de tamaño: 20 μ m. *** $p < 0,001$. n=3 experimentos independientes (10 campos por condición y experimento).

Se observó que el tratamiento con o-ATV incrementaba el porcentaje de neuronas GABAérgicas que expresaban pCREB, pasando de un 53% en condiciones de OGD/R+vehículo a un 95% en condiciones OGD/R+o-ATV (Figura 33). Estos resultados indicaban que, tras solamente 1 h de tratamiento con o-ATV, y antes de que se produzca muerte elevada en los cultivos (Figura 26), casi la totalidad de las neuronas de fenotipo GABAérgico muestran niveles elevados del factor de supervivencia pCREB. Los resultados obtenidos indicaban que la

administración de o-ATV al inicio de la fase R presenta un efecto específico sobre las neuronas GABAérgicas incrementando los niveles de pCREB.

10.2.2. Efecto de la administración de ATV u o-ATV al inicio de la fase R sobre la muerte neuronal inducida por OGD/R

Seguidamente se analizó si el incremento de pCREB en neuronas GABAérgicas se traducía en la protección de las neuronas corticales expuestas a OGD/R. Para estudiar el efecto del tratamiento con ATV u o-ATV sobre la muerte inducida por OGD/R, se sometieron los cultivos de neuronas corticales a OGD/R y se administró vehículo, 600 nM o-ATV o 600 nM ATV al inicio de la fase R. También se analizó el efecto del tratamiento a 100 nM o-ATV o 100 nM ATV, concentración del metabolito o-ATV que se halla presente en suero de pacientes tratados con ATV (Lins et al., 2003; Guillen et al., 2009). En ambos casos determinamos la muerte neuronal a los 15 min, 1 h y 24 h de R, cuantificando la incorporación de *propidium iodide* (PI).

El tratamiento con 600 nM o-ATV al inicio de la fase R redujo la muerte neuronal inducida por OGD/R en todos los tiempos de estudio; un 60% de reducción a los 15 min, un 31% a 1 h y un 21.8% a las 24 h de R (Figura 34). Por otro lado, el tratamiento con 100 nM o-ATV al inicio de la fase R redujo un 62% la muerte neuronal a los 15 min y un 47% 1 h tras la OGD, aunque no alcanzó a ejercer protección sobre la muerte a las 24 horas de R (Figura 35). En cambio, el tratamiento con ATV no presentó efecto protector frente a la muerte inducida por OGD/R en ninguna de las dos concentraciones testadas (Figura 34 y 35).

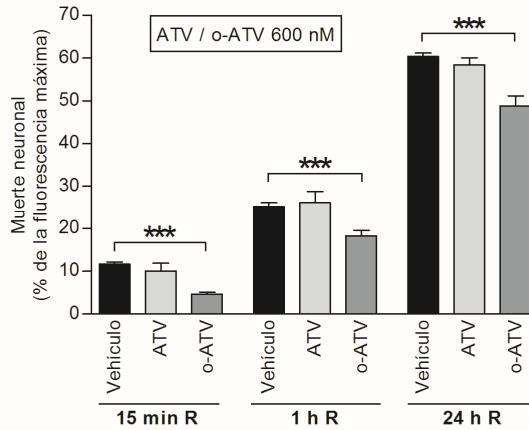


Figura 34. Efecto del tratamiento con 600 nM de ATV u o-ATV al inicio de R sobre la muerte neuronal inducida por OGD/R. Gráfico que muestra el efecto del tratamiento con 600 nM ATV o 600 nM o-ATV sobre la muerte neuronal en cultivos sometidos a OGD/R, a los 15 min, 1 h y 24 h del inicio de la fase R. *** $p < 0,001$. $n = 4$ experimentos independientes (>9 determinaciones por condición y experimento).

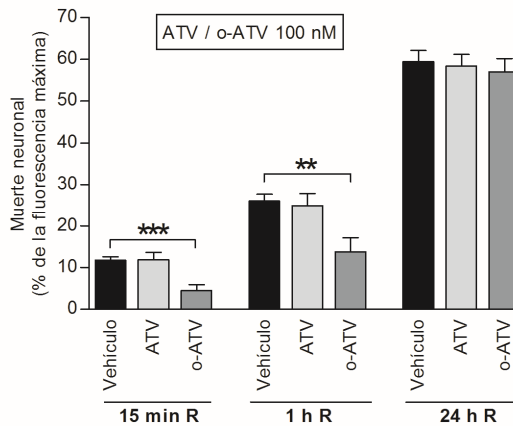


Figura 35. Efecto del tratamiento con 100nM de ATV u o-ATV al inicio de la fase R sobre la muerte neuronal inducida por OGD/R. Gráfico que muestra el efecto del tratamiento con 100 nM ATV o 100 nM o-ATV sobre la muerte neuronal en cultivos sometidos a OGD/R, a los 15 min, 1 h y 24 h del inicio de la fase R. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n = 4$ experimentos independientes (>9 determinaciones por condición y experimento).

Los resultados obtenidos indicaron que el tratamiento con ATV al inicio de la fase R no tiene efecto sobre pCREB ni sobre la viabilidad de los cultivos de neuronas corticales. En cambio, el tratamiento con el metabolito o-ATV, que habíamos visto que incrementaba pCREB en las neuronas GABAérgicas, es neuroprotector a los 15 min, 1 h y 24 h del inicio de la fase R a la concentración de 600 nM (que se encuentra muy por debajo de las concentraciones tóxicas). Incluso una dosis 6 veces más baja (100 nM), que se ha determinado en sangre de pacientes tratados con la estatina ATV, consigue aportar protección en las fases iniciales (1 h de R).

Tal y como sugería el efecto específico de o-ATV incrementando pCREB en un subtipo neuronal específico, observamos que a las 24 h de R las neuronas que sobreviven constituyen un subgrupo de neuronas de mayor tamaño (>10 μm de diámetro) que, tal y como hemos determinado en el apartado de caracterización, corresponden a neuronas GABAérgicas (Figura 36).

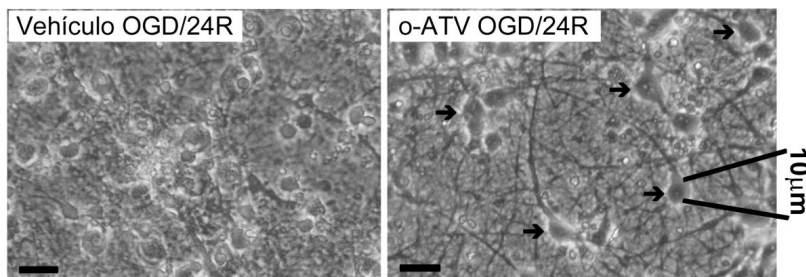


Figura 36. El tratamiento con o-ATV al inicio de la fase R incrementa la supervivencia de neuronas GABAérgicas sometidas a OGD/R. Imagen en contraste de fases representativas de neuronas corticales en cultivos expuestos a OGD/R-vehículo u OGD/R+600 nM o-ATV a las 24h de R. Las neuronas que sobrevivían por el tratamiento con o-ATV corresponden a neuronas de un tamaño >10 μm de diámetro (flechas). Barra de tamaño, 20 μm . Resultados similares se observan en 4 experimentos independientes.

Seguidamente analizamos si el efecto de la administración de o-ATV, que incrementa la expresión de pCREB en neuronas GABérgicas, se traducía en la protección específica de este subtipo neuronal frente a la muerte excitotóxica. Se observó que el tratamiento con o-ATV incrementa el porcentaje de neuronas que expresan GAD-65/67 en cultivos sometidos a OGD/R1h (Figura 37A, C). Se determinó un incremento del porcentaje de neuronas GABAérgicas en condiciones de OGD/R a pesar de que observamos una reducción en el número de

núcleos totales durante la primera hora de reperfusión (Figura 37B). Estos resultados sugerían que las neuronas GABAérgicas sobrevivían en condiciones en las que las neuronas no GABAérgicas sucumben, así las neuronas GABAérgicas serían más resistentes al daño excitotóxico. Se descartó la posibilidad de que o-ATV incrementara el porcentaje de neuronas GABAérgicas presentes en los cultivos en condiciones control (Figura 37A,B).

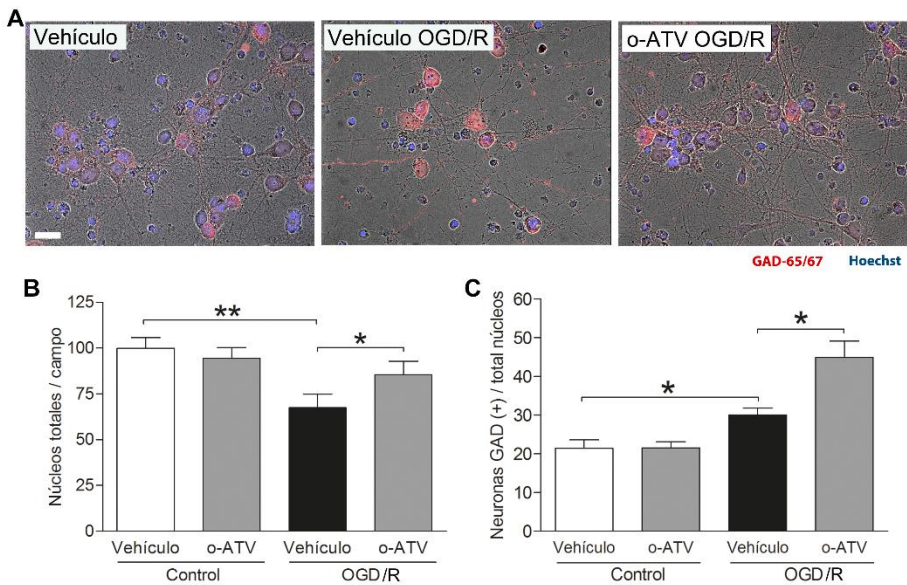


Figura 37. Efecto del tratamiento con o-ATV al inicio de la fase R sobre las neuronas GABAérgicas sometidas a OGD/R. **A)** Imágenes representativas de cultivos neuronales a 1 h de R en condiciones control, OGD/R + vehículo y OGD/R + 600 nM o-ATV mostrando GAD en rojo, y núcleo en azul. **B)** Gráfico que muestra la muerte neuronal en situaciones control o de OGD/R a 1 h de R en cultivos tratados al inicio de la reperfusión con vehículo o 600 nM de o-ATV. **C)** Gráfico que muestra el número de neuronas GAD(+) respecto al total de núcleos en condiciones control + vehículo, control + 600 nM o-ATV, OGD/R + vehículo y OGD/R + 600 nM o-ATV a 1 h de fase R. Barra de tamaño: 20 μ m. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. $n = 3$ experimentos independientes (10 campos por condición y experimento).

Los resultados obtenidos mostraron que la administración de o-ATV al inicio de la fase R protege a las neuronas GABAérgicas presentes en cultivos de neuronas corticales frente a la muerte inducida por OGD/R, posiblemente mediante su efecto incrementando los niveles de pCREB específicamente en este subtipo neuronal.

10.2.3. Evaluación de un posible efecto antioxidante como mecanismo neuroprotector de o-ATV

Seguidamente, se determinó si el efecto neuroprotector inducido específicamente por el tratamiento con o-ATV podía explicarse, en parte, por el perfil antioxidante diferencial entre ATV y o-ATV reportado en test de oxidación lipídica (Mason et al., 2006; Mason, 2006). Para ello, se sometieron los cultivos de neuronas corticales de 12 DIV a OGD y al inicio de la fase R se administraron 100 nM ATV u o-ATV, concentración que ha mostrado capacidad de reducir la muerte neuronal temprana. Tras 30 o 90 min de fase R, se fijaron las células y se determinó la producción de 4-hydroxy-2E-nonenal (4-HNE), producto final de la peroxidación lipídica (Figura 38A).

La OGD/R provocó un incremento de la producción de 4-HNE. Tanto el tratamiento con ATV como con o-ATV redujeron en un 80% la producción de 4-HNE inducida por OGD/R a los 30 min de la fase R (Figura 38A, B). Esta reducción de la producción de 4-HNE fue máxima a los 90 min de fase R, cuando ambos tratamientos equipararon los niveles de 4-HNE a los observados en condiciones control (Figura 38C). Se determinó que la reducción de 4-HNE se producía en los dos subtipos neuronales de nuestros cultivos, tal y como se puede observar en las ampliaciones de la siguiente figura (Figura 38A). No se estudió el efecto sobre la producción de 4-HNE con la dosis de 600 nM debido a que el tratamiento con ambos compuestos a 100 nM ya conseguía una reducción total de los niveles de 4-HNE.

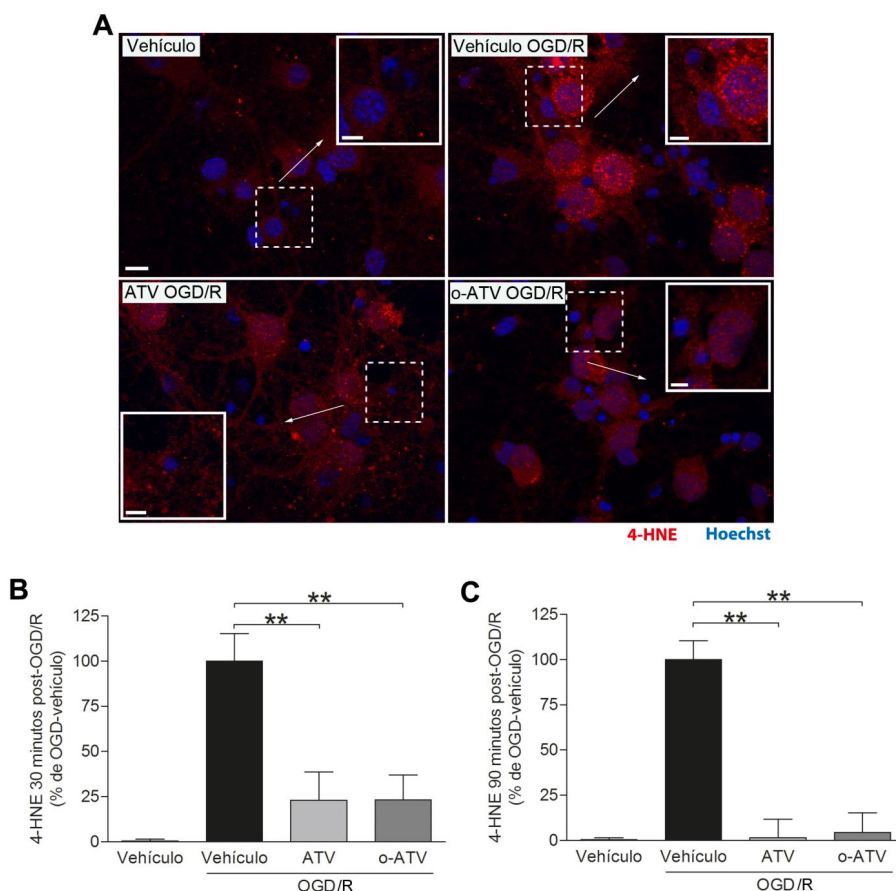


Figura 38. Efecto del tratamiento con ATV u o-ATV al inicio de la fase R sobre la producción de 4-HNE en cultivos neuronales sometidos a OGD/R. A) Imágenes representativas en condiciones Control (Vehículo), OGD/R+Vehículo, OGD/R+100 nM ATV u OGD/R+100 nM o-ATV mostrando 4-HNE en rojo y núcleos en azul a los 30 min de R. Gráficos que muestran la cuantificación de los niveles de fluorescencia de 4-HNE en condiciones Control (Vehículo), OGD/R+Vehículo, OGD/R+100 nM ATV o OGD/R+100 nM o-ATV a los 30 min (B) o 90 min de R (C). Barra de tamaño: 10 μ m. ** $p < 0,01$. $n = 3$ experimentos independientes (10 campos por condición y experimento).

El estudio de los niveles de 4-HNE demostró que ambos compuestos presentaban el mismo nivel de efecto antioxidante y afectaban tanto a neuronas piramidales excitadoras ($< 10 \mu$ m) como neuronas GABAérgicas ($> 10 \mu$ m). Sin embargo, en los anteriores ensayos, solamente o-ATV ha incrementado pCREB y ha presentado efecto neuroprotector específicamente en la población de neuronas GABAérgicas.

10.2.4. Las neuronas de subtipo GABAérgico presentan una mayor riqueza de NMDARs sinápticos

Los resultados mostrados en los apartados 10.1 y 10.2, indicaban que la activación específica de NMDARs sinápticos post-OGD aumenta pCREB en ambos subtipos neuronales. También que el tratamiento con o-ATV post-OGD incrementaba la expresión de pCREB en las neuronas GABAérgicas de nuestros cultivos y las protegía de la muerte inducida por OGD/R. En base a estos resultados, el siguiente paso consistió en el análisis de la localización de los NMDARs en los dos subtipos de neuronas presentes en nuestros cultivos, con el objetivo de encontrar una posible explicación al efecto neuroprotector específico de tipo celular observado con el tratamiento con o-ATV.

En primer lugar se determinó la expresión de la subunidad NR2A (principalmente sináptica) y neurologina (marcador sináptico) en cultivos de neuronas corticales control, observando que ambas se expresan y colocalizan tanto en neuronas GABAérgicas ($>10 \mu\text{m}$) como en neuronas piramidales excitadoras ($<10 \mu\text{m}$) (Figura 39).

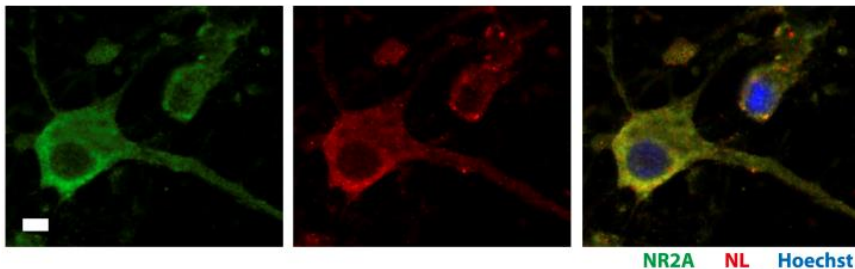


Figura 39. Expresión de la subunidad NR2A y neurologina en cultivos de neuronas corticales control. Imágenes representativas en condiciones control de la subunidad NR2A en verde, el marcador sináptico neurologina en rojo y la colocalización entre ambos en amarillo. Barra de tamaño: $5 \mu\text{m}$.

Seguidamente, se sometieron los cultivos a OGD/R1h y se analizó la colocalización de las subunidades NR2A y NR2B con neurologina en cada uno de los subtipos neuronales. Se observó que la subunidad NR2A, colocalizaba con el marcador de sinapsis neurologina tanto en las neuronas GABAérgicas ($>10 \mu\text{m}$) como en las neuronas excitadoras piramidales (Figura 40A, C) sin experimentar cambios inducidos por OGD/R. Estos resultados indicaban que, en nuestro cultivo, la subunidad NR2A era principalmente sináptica tanto en neuronas GABAérgicas como en neuronas piramidales, si bien la colocalización en las primeras era máxima (Coeficiente de Pearson \sim 1) pero menor en las segundas (Figura 40C).

Por otro lado, en las neuronas GABAérgicas, la subunidad NR2B colocalizaba de forma moderada (aprox. 0,6) con neurologina en condiciones control, mientras que la OGD/R disminuía la localización sináptica de esta subunidad. En cambio, en neuronas piramidales la colocalización de NR2B con NL estaba por debajo de 0,5 y disminuía a 0,25 en cultivos expuestos a OGD/R1h (Figura 40B, D).

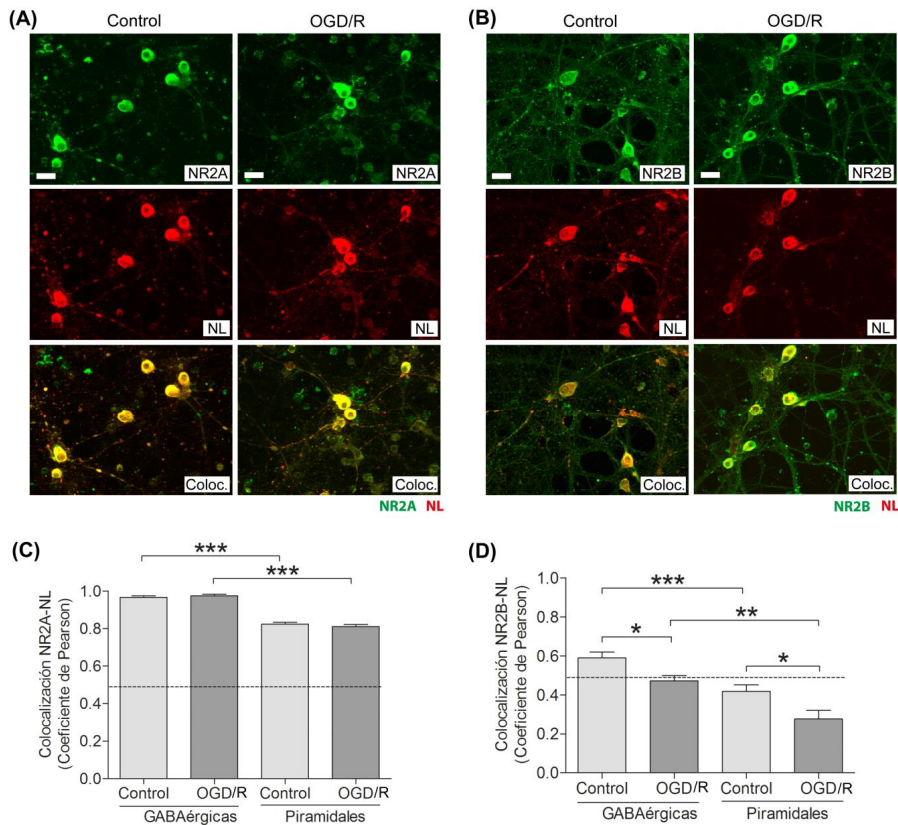


Figura 40. Colocalización de las subunidades NR2A y NR2B con el marcador de sinapsis neuroigina. **A)** Imágenes representativas en condiciones Control u OGD/R mostrando la subunidad NR2A en verde, el marcador sináptico neuroigina en rojo y la colocalización entre ambos en amarillo. **B)** Imágenes representativas en condiciones Control u OGD/R mostrando la subunidad NR2B en verde, el marcador sináptico neuroigina en rojo y la colocalización entre ambos en amarillo. **C)** Gráfico que muestra el porcentaje de colocalización en base al coeficiente de Pearson de NR2A con NL en neuronas GABAérgicas (GAD(+), >10 nm) y neuronas excitadoras piramidales (GAD(-), <10 nm). **D)** Gráfico que muestra el porcentaje de colocalización en base al coeficiente de Pearson de NR2B con NL en neuronas GABAérgicas (GAD(+), >10 nm) y neuronas excitadoras piramidales (GAD(-), <10 nm). Barra de tamaño: 20 μ m. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001. n =3 experimentos independientes (15 campos por condición y experimento).

En conjunto, los resultados obtenidos en la primera parte de la presente tesis doctoral demostraron que la activación de NMDARs sinápticos tras la OGD/R, produce una activación rápida de CREB tanto en neuronas excitadoras como en neuronas de subtipo GABAérgico que correlaciona con neuroprotección en ambos subtipos. Por otro lado, el tratamiento con o-ATV al inicio de R produce un rápido

incremento de los niveles de pCREB en neuronas GABAérgicas, neuronas que se encuentran protegidas por o-ATV frente a la muerte inducida por OGD/R y que presentan mayor proporción de NMDAR sinápticos, cruciales para la señalización pro-vida de pCREB.

11. RESULTADOS PARTE 2: Intervención sobre NMDARs extrasinápticos

Teniendo en cuenta la implicación directa de los NMDARs extrasinápticos en la muerte neuronal excitotóxica y los limitados conocimientos de que se dispone sobre la vía de señalización extrasináptica en comparación con la de los receptores sinápticos, la segunda parte de la presente tesis se dirigió a estudiar las proteínas asociadas a la subunidad NR2B de los NMDARs, subunidad descrita como extrasináptica principalmente. Hasta el momento en la bibliografía se describen dos moléculas (DAPK1 y GIPC) como las únicas que parecen unirse específicamente a la subunidad NR2B de los NMDARs pero no a la subunidad NR2A (Yi et al., 2007; Tu et al., 2010), siendo la subunidad NR2B la que se encuentra principalmente en los NMDARs que se hallan en las zonas extrasinápticas (Stocca and Vicini, 1998; Tovar and Westbrook, 1999; Hardingham et al., 2002; Vizi et al., 2013). Utilizamos inmunoprecipitación selectiva con anticuerpos específicos anti-DAPK1 y anti-GIPC y posterior análisis proteómico de los inmunoprecipitados para hallar nuevas dianas con potencial de mediar la muerte neuronal inducida por activación de los NMDARs extrasinápticos. Realizamos coinmunoprecipitación (Co-IP) sobre dos tipos de muestras distintas: 1) proteína total obtenida de homogenizado total de neuronas que incluye membrana y citoplasma y 2) muestras de proteína correspondiente a homogenizado de membrana plasmática neuronal.

11.1. Caracterización del efecto de nuestro modelo de OGD/R sobre los niveles, procesamiento proteolítico y fosforilaciones de interés de NR2B, DAPK1 y GIPC

En primer lugar se caracterizó el efecto de nuestro modelo de OGD/R sobre las proteínas NR2B, DAPK1 y GIPC. Para poder determinar posibles candidatos sobre los que actuar antes de la existencia de muerte neuronal significativa, se

estableció 30 min de fase R como el tiempo idóneo para la obtención de las muestras.

11.1.1. NR2B

Se analizaron los niveles y el procesamiento de la subunidad NR2B de los NMDARs en cultivos de neuronas corticales control comparando con neuronas sometidas a OGD/R30min. La subunidad NR2B intacta tiene un peso molecular de 170KDa. Se detectó, tanto tras OGD/R en extractos neuronales como tras la MCAO en ratas, una disminución de aproximadamente el 30-40% de la banda de 170KDa de NR2B acompañada de un incremento del 40-50% de la banda de 115KDa (Figura 41A, C, D). Por otro lado, no se observó efecto significativo sobre los niveles totales de la subunidad NR2B ni por WB (Figura 41A,B) ni por ICF (Figura 41E,F).

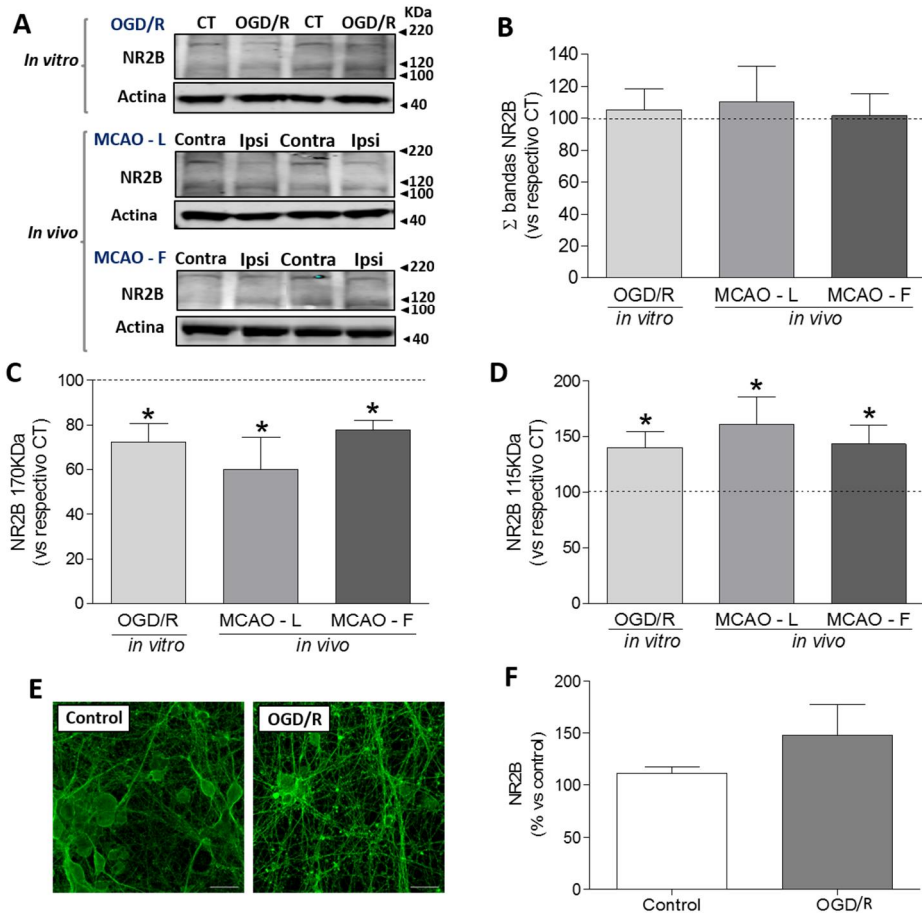


Figura 41. Efecto de la OGD/R y MCAO sobre los niveles proteicos y la proteólisis de la subunidad NR2B. **A)** WB representativos mostrando las bandas correspondientes a NR2B en cultivos control o sometidos a OGD/R30min o en ratas sometidas a MCAO mediante la técnica de ligadura (MCAO-L) o filamento intraluminal (MCAO-F). **B-D)** En estudios *in vitro* comparamos cultivos en condiciones control (CT) con cultivos sometidos a OGD/R30min (OGD/R). *In vivo* comparamos el hemisferio contralateral sano (Contra) con el hemisferio ipsilateral (Ipsi) de cada animal 2 h tras la reperusión. Los gráficos muestran el incremento de los niveles totales de NR2B (indicados como sumatorio de bandas (Σ)) (**B**), de la banda de 170 KDa (**C**) y la banda de 115 KDa a partir de las bandas observadas en los WB (**D**). **E)** Imágenes representativas de NR2B obtenidas por ICF en cultivos de neuronas corticales de 12 DIV en condiciones control u OGD/R30min. **F)** Gráfico que muestra la cuantificación de la densidad óptica correspondiente a NR2B respecto al número de núcleos en cultivos neuronales en condiciones control u OGD/R30min. Barra de tamaño: 20 μm . * $p < 0,05$ respecto al control (*in vitro*) o hemisferio contralateral (*in vivo*). $n=3$ experimentos en los estudios de OGD/R (>9 pocillos por condición) y $n=6$ por grupo en los experimentos *in vivo*.

11.1.2. DAPK1

En células sanas, DAPK1 se encuentra fosforilada e inactiva, en cambio, bajo señales de muerte neuronal se produce la defosforilación de DAPK1 que pasa a su estado activado (Shohat et al., 2001). Se analizaron los niveles proteicos de DAPK1 fosforilada en nuestro sistema en condiciones control y tras someter los cultivos a OGD/R. Nuestro modelo de OGD/R provocó la activación de DAPK1 en los cultivos corticales, observándose una reducción del 70% en los niveles de DAPK1 fosforilada a los 30 min de la fase R (Figura 42). No fue posible establecer el efecto sobre la fosforilación de DAPK1 en los modelos de ictus *in vivo*, MCAO por ligadura o filamento intraluminal, debido al débil funcionamiento del anticuerpo para pDAPK1 y a la limitada disponibilidad de anticuerpos para esta proteína.

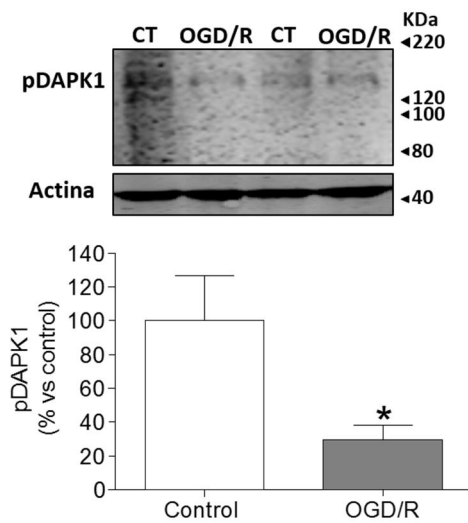


Figura 42. Estado de fosforilación de DAPK1 en cultivos de neuronas corticales de 12 DIV. Arriba; WB representativo mostrando pDAPK1 y actina en condiciones control (CT) o de OGD/R30min (OGD). Abajo; gráfico que muestra los niveles de pDAPK1 normalizados por actina a los 30 min de la fase R. * $p < 0,05$ respecto al control. $n=4$ experimentos independientes (5 réplicas por condición y experimento)

A continuación se determinaron los niveles de la proteína DAPK1 en cultivos neuronales sometidos a OGD/R y en modelos animales de isquemia cerebral. Los niveles totales de DAPK1 incrementaron en respuesta a la isquemia, tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 43A-B, F-G).

DAPK1 es una proteína de 160 KDa de la que algunos autores habían reportado un procesamiento por catepsina B que genera fragmentos de 120, 100 y 60 KDa (Araki et al., 2004, Shamloo et al., 2005). En cambio, otros trabajos no comentaban este procesamiento proteolítico y se centraban en el estudio de la banda de 160 KDa de DAPK1 (Cohen et al., 1999; Raveh and Kimchi, 2001; Pelled et al., 2002; Tu et al., 2010). En nuestro modelo, se observó un efecto de la OGD/R30min y de la MCAO sobre el patrón de bandas de DAPK1. En condiciones control, o en el hemisferio contralateral en el caso de los animales, se observó una banda de 160 KDa y otras dos bandas de 120 KDa y 100 KDa. En cambio, el estímulo excitotóxico (OGD/R30min o MCAO), provocaba la reducción de la banda de 160 KDa acompañada de un incremento de la banda de 100 KDa (Figura 43A, C-E).

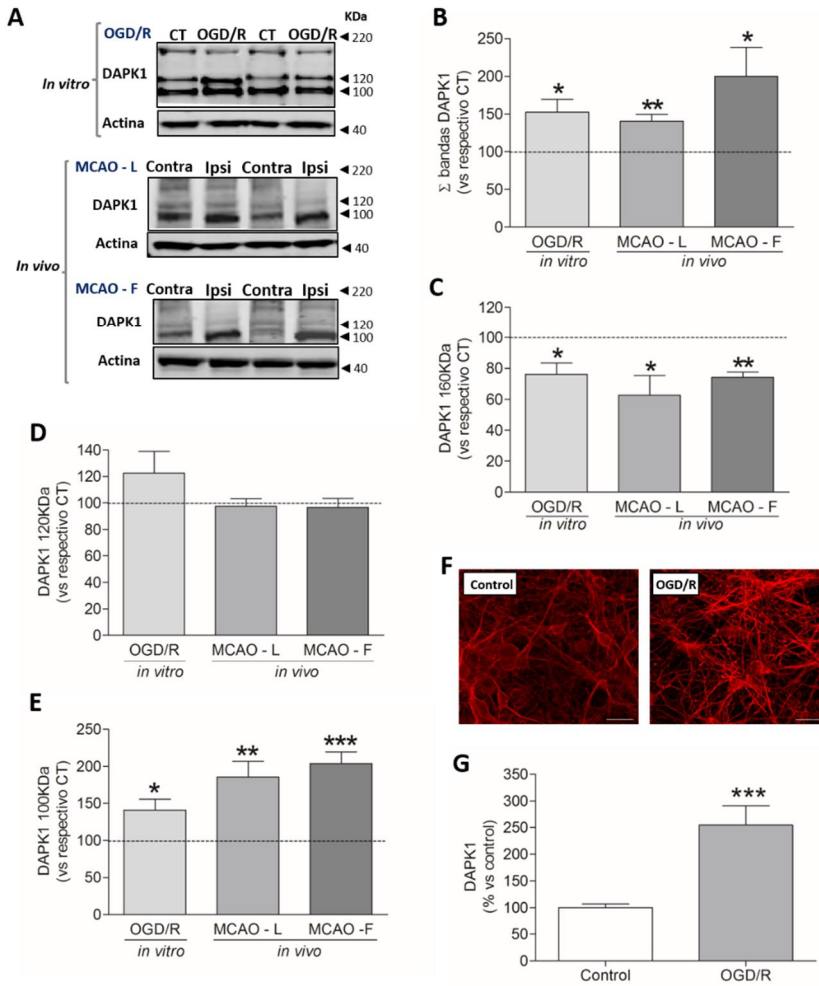


Figura 43. Efecto de la OGD/R y MCAO sobre los niveles proteicos y la proteólisis de DAPK1.

A) WB representativos de los niveles de la proteína DAPK1 en cultivos sometidos a OGD/R30min o en ratas sometidas a MCAO mediante la técnica de ligadura (MCAO-L) o filamento intraluminal (MCAO-F). **B-E)** En estudios *in vitro* comparamos cultivos en condiciones control (CT) con cultivos sometidos a OGD/R30min (OGD/R). *In vivo* comparamos el hemisferio contralateral sano (Contra) con el hemisferio ipsilateral (Ipsi) de cada animal 2 h tras la reperusión. Los gráficos muestran la cuantificación de los niveles de la proteína DAPK1 total (indicados como sumatorio de bandas (Σ)) (**B**), de la banda de 160KDa (**C**), de la banda de 120 KDa (**D**) y de la banda de 100 KDa (**E**) en las condiciones anteriormente detalladas. **F)** Imagen representativa de DAPK1 en cultivos de neuronas corticales en condiciones control u OGD/R30min. **G)** Gráfico correspondiente a la cuantificación de la densidad óptica de DAPK1 respecto al número de núcleos en cultivos neuronales de 12 DIV en condiciones control u OGD/R30min. *Barra de tamaño:* 20 μm . * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto al control (*in vitro*) o hemisferio contralateral (*in vivo*). $n=3$ experimentos en los estudios de OGD/R (>9 pocillos por condición) y $n=6$ por grupo en los experimentos *in vivo*.

11.1.3. GIPC

Como en el caso de NR2B y DAPK1, se analizaron los niveles de la proteína GIPC en cultivos de neuronas corticales control o sometidas a OGD/R30min y en ratas sometidas a MCAO mediante ligadura o filamento intraluminal. Se determinó un incremento de los niveles de GIPC tanto en los cultivos sometidos a la OGD/R como en el hemisferio ipsilateral de ratas MCAO-L y MCAO-F en comparación con el hemisferio contralateral (Figura 44). No se observó ningún efecto de proteólisis para esta proteína.

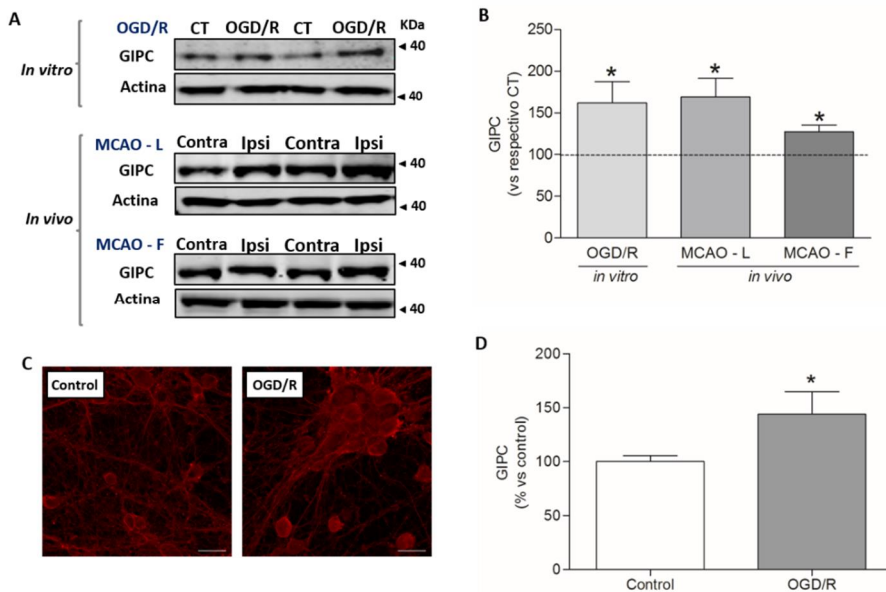


Figura 44. Efecto de la OGD/R y MCAO sobre los niveles proteicos de GIPC. **A)** WB representativos de la proteína GIPC en cultivos sometidos a OGD/R30min o en ratas sometidas a MCAO mediante la técnica de ligadura (MCAO-L) o filamento intraluminal (MCAO-F). En estudios *in vitro* comparamos cultivos en condiciones control (CT) con cultivos sometidos a OGD/R30min (OGD/R). *In vivo* comparamos el hemisferio contralateral sano (Contra) con el hemisferio ipsilateral (Ipsi) de cada animal 2 h tras la reperusión. **B)** Gráfico que muestra el incremento en porcentaje de los niveles de GIPC respecto cultivos controles o hemisferio contralateral. **C)** Imagen representativa de GIPC en cultivos de neuronas corticales de 12 DIV en condiciones control u OGD/R30min. **D)** Gráfico correspondiente a la cuantificación de la densidad óptica correspondiente a GIPC respecto al número de núcleos en cultivos neuronales en condiciones control u OGD/R. Barra de tamaño: 20 μ m. * $p < 0,05$ respecto al control (*in vitro*) o hemisferio contralateral (*in vivo*). $n = 3$ experimentos en los estudios de OGD/R (>9 pocillos por condición) y $n = 6$ por grupo en los experimentos *in vivo*.

Una vez finalizada la caracterización de NR2B, DAPK1 y GIPC, pudimos afirmar que nuestro modelo de isquemia *in vitro* por OGD/R30min en cultivos neuronales y la isquemia focal *in vivo* con 2h de reperusión, no alteran los niveles totales de NR2B, elevan los niveles totales de DAPK1 y GIPC e incrementan el procesamiento proteolítico de NR2B y DAPK1.

11.2. Obtención de los complejos de proteína asociados a los NMDARs extrasinápticos

11.2.1. Caracterización de la técnica de coimmunoprecipitación

Una vez caracterizado el efecto de la isquemia sobre los niveles y la proteólisis de NR2B, DAPK1 y GIPC en cultivos neuronales de 12 DIV expuestos a OGD/R y animales sometidos a MCAO, y dado que nuestro interés era identificar moléculas que se encuentren por debajo de los receptores extrasinápticos, se procedió a la Co-IP de los complejos proteicos unidos a DAPK1 o a GIPC mediante anticuerpos específicos contra estas dos proteínas. Se utilizaron dos tipos de muestra de partida diferentes (Figura 45); por un lado se partió de muestra total, compuesta por membrana plasmática y contenido citoplasmático y por otro lado utilizamos muestra de membrana plasmática obtenida según el protocolo descrito en el apartado 8.2.

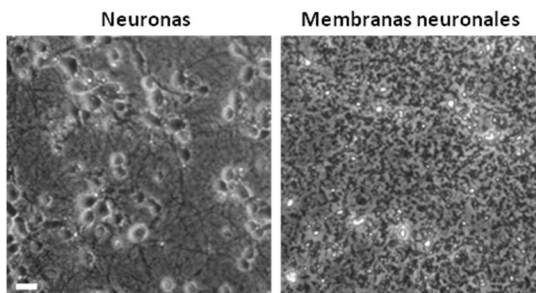


Figura 45. Imágenes en contraste de fases de cultivos neuronales de 12DIV. Izquierda; Imagen representativa de neuronas en cultivo de las que se obtuvo muestra total. Derecha; Imagen representativa de membranas neuronales adheridas a la placa de cultivo utilizadas para la obtención de muestra de membrana plasmática según el protocolo descrito en el apartado 8.2. Ya no se pueden observar cuerpos neuronales pero sí membranas del cuerpo celular neuronal y de dendritas.

11.2.2. Co-inmunoprecipitación de proteína extraída de muestra total

En primer lugar se inmunoprecipitaron muestras de proteína total. Para comprobar la especificidad del proceso, realizamos en paralelo una inmunoprecipitación con anticuerpo específico anti-DAPK1 y otra con IgG no específica (N.S. IgG; de características similares al anticuerpo específico anti-DAPK1 que utilizamos; mismo isotipo de inmunoglobulina no conjugada purificada por afinidad). En la Co-IP realizada con anticuerpo específico anti-DAPK1 (Co-IP-DAPK1) detectamos las bandas de 160, 120 y 100KDa correspondientes a DAPK1. Sin embargo, no observamos bandas correspondientes a DAPK1 en el WB de la Co-IP con anticuerpo anti-N.S. IgG, confirmando así que la inmunoprecipitación era específica para DAPK1 (Figura 46).

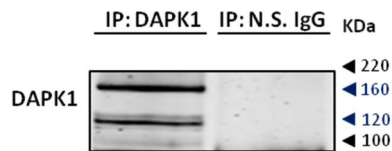


Figura 46. Co-IP de muestra total control con anticuerpo específico anti-DAPK1 o con IgG no específica (N.S. IgG). WB representativo mostrando dos bandas mayoritarias de la proteína DAPK1 (160 y 120 KDa) y la banda de 100 KDa en el Co-IP-DAPK1 (*izquierda*) o la ausencia de bandas en el Co-IP con IgG inespecífica (*derecha*). Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

Observamos que se favorecía la inmunoprecipitación de la forma de 160 KDa de DAPK1 acompañada de la banda de 120 KDa y en menor medida la banda de 100 KDa. La banda de 160 KDa constituía la forma más abundante en el complejo inmunoprecipitado en condiciones control, pero era una de las bandas menores en el homogeneizado obtenido de los cultivos de neuronas corticales control.

En el eluido del Co-IP-DAPK1 obtenido de muestra total control, se analizó la presencia de la subunidad NR2B, previamente descrita en la bibliografía como asociada a DAPK1 (Tu et al 2010). También se analizó la presencia de PSD95, proteína descrita asociada a NR2B (Aarts et al., 2002; Sun et al., 2008). Los

resultados obtenidos confirmaron la Co-IP de NR2B, PSD95 y DAPK1 en el Co-IP-DAPK1 control (Figura 47).

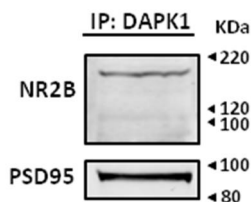


Figura 47. Co-IP de muestra total control con anticuerpo anti-DAPK1. WB representativo de la subunidad NR2B y la proteína PSD95 coimmunoprecipitadas con DAPK1.

Por otro lado, se realizó la Co-IP utilizando anticuerpo específico anti-GIPC. Al analizar el inmunoprecipitado de muestra control mediante WB se detectó débilmente la proteína GIPC pero no se visualizaron bandas para NR2B ni para otras proteínas que sabemos que se unen a NR2B como PSD95 (Figura 48). Se repitió este procedimiento utilizando dos anticuerpos diferentes de GIPC pero en ningún caso se consiguieron inmunoprecipitar las proteínas esperables según lo descrito en la bibliografía.

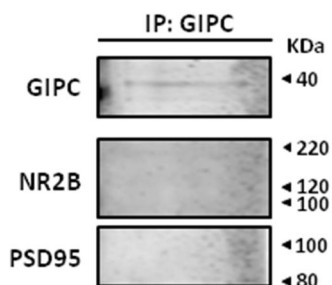


Figura 48. Co-IP con anticuerpo anti-GIPC en muestra total control. WB representativos de GIPC y de las proteínas candidatas a co-inmunoprecipitar con ella; NR2B y PSD95.

Si bien hasta el momento no se ha descrito interacción directa ni se ha demostrado inmunoprecipitación conjunta de DAPK1 y GIPC, el hecho de que ambos interaccionaran con NR2B permitió hipotetizar que en las muestras inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-DAPK1 podríamos hallar también la proteína GIPC. Los resultados de WB demostraron, efectivamente, la presencia de GIPC en el Co-IP-DAPK1 (Figura 49).

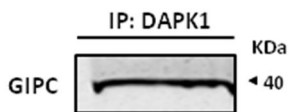


Figura 49. Co-IP de GIPC con anticuerpo anti-DAPK1 en muestras total control. WB representativo de GIPC co-inmunoprecipitada con DAPK1.

En base a estos resultados, y teniendo en cuenta que en el Co-IP-DAPK1 obtuvimos las proteínas esperadas y entre ellas GIPC, se decidió descartar la Co-IP-GIPC y continuar el estudio utilizando la Co-IP-DAPK1 como método de elección para el posterior análisis proteómico.

11.2.3. Co-IP de proteína extraída de muestra de membrana plasmática

Seguidamente se realizó la Co-IP-DAPK1 a partir de muestra de membrana plasmática. Mediante el análisis del inmunoprecipitado se determinó la Co-IP de DAPK1, NR2B y PSD95 pero no de la proteína GIPC (Figura 50).

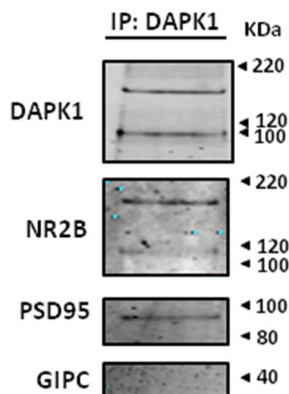


Figura 50. Co-IP con DAPK1 en muestras de membrana control. WB representativos de DAPK1 y de las proteínas co-inmunoprecipitadas con ella; NR2B, PSD95 y GIPC. No observamos señal para GIPC.

11.2.4. Análisis de las formas proteolíticas de DAPK1 obtenidas en la Co-IP-DAPK1 de muestra total y de muestra de membrana plasmática

El estudio comparativo del perfil de bandas del Co-IP-DAPK1 control y OGD/R en muestra total o de membrana indica que: tras 30 min de fase R, la OGD/R no afecta los niveles totales de DAPK1 obtenidos en el Co-IP-DAPK1 de muestra total, mientras que incrementa los niveles totales de DAPK1 en las muestras de membrana (Figura 51 A-D).

Tanto en muestra total como en muestra de membrana, la OGD/R redujo la presencia en el Co-IP-DAPK1 de la forma intacta de 160KDa de DAPK1 (Figura 51A, B, E, F) e incrementó la forma proteolítica de 100KDa (Figura 51 A, B, G, H). En muestra total, pero no en muestra de membrana, se detectó también la forma de 120KDa (Figura 51 A, B, I). En ambos tipos de muestra, observamos que tras la OGD/R30min, la mayor parte de DAPK1 está en la forma de 100 KDa, siendo esta banda de 100 KDa la forma que habíamos observado incrementada en homogenados de cultivos neuronales sometidos a OGD/R y en modelos animales de MCAO (Figura 43A).

En el Co-IP-DAPK1 determinamos que la proteólisis sufrida por DAPK1 no impidió la Co-IP de la subunidad NR2B. Aproximadamente la mitad de moléculas de NR2B presentes en el Co-IP-DAPK1 también había sufrido proteólisis en muestra de membrana y casi la totalidad se hallaba proteolizada en muestra total (Figura 51J).

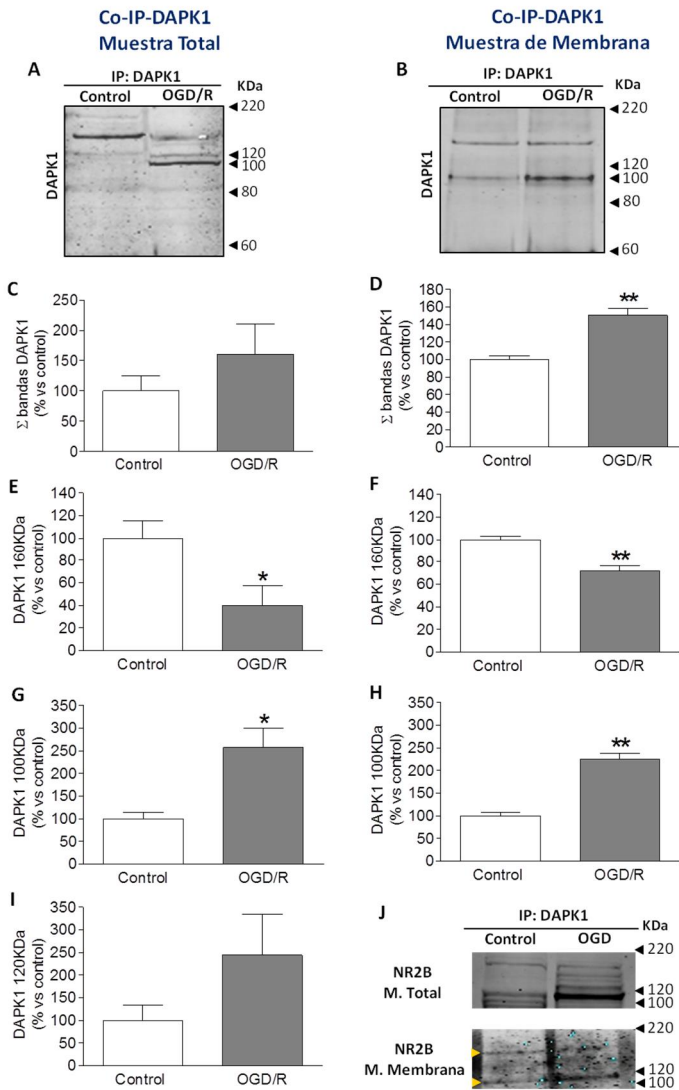


Figura 51. Comparación del perfil proteolítico de DAPK1 en el Co-IP-DAPK1 de muestra total y de membrana plasmática neuronal.

WB representativos de DAPK1 en el Co-IP-DAPK1 de muestra total (A) y de muestra de membrana (B). C-I) Se cuantificaron las bandas (o la suma de las bandas) correspondientes a DAPK1. Los gráficos muestran la cuantificación de la suma de bandas correspondientes a DAPK1 en muestra total (C) o de membrana (D), la banda de 160KDa en muestra total (E) o de membrana (F), la banda de 100KDa en muestra total (G) o de membrana (H) y la banda de 120KDa en muestra total (I). J) WB representativos de la subunidad NR2B en el Co-IP-DAPK1 de muestra total o muestra de membrana. Se indican con punta de flecha amarilla las bandas correspondientes a NR2B que son difíciles de apreciar en muestra de membrana. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto al control. $n = 3$ experimentos independientes.

11.3. Estudio de los complejos coimmunoprecipitados: identificación de posibles candidatos neuroprotectores frente a riesgo excitotóxico

11.3.1. Análisis de las proteínas identificadas por LC-MS/MS con presencia diferencial en el Co-IP-DAPK1 de muestra total

En primer lugar, se analizó el complejo de proteínas obtenido en la Co-IP-DAPK1 de muestra total mediante LC-MS/MS. Se identificaron un total de 303 proteínas con al menos dos péptidos únicos. Se hallaron cuarenta y nueve proteínas cuyos niveles diferían >2.5 veces entre los cultivos control y los sometidos a OGD/R. De estas proteínas, 18 estaban incrementadas, 9 aparecían, 16 disminuían y 6 desaparecían en condiciones de OGD/R30min (Tablas 10 y 11).

Tabla 10. Proteínas que aparecen o incrementan su asociación al Co-IP-DAPK1 tras la OGD/R en muestra total.

Proteína	Uniprot	Función molecular - Isquemia	Incremento (foldchange OGD/CT)	Interacción publicada con:
Proteínas de membrana				
<i>Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B</i> (NR2B)	Q00960	Subunidad principalmente extrasináptica que señala a muerte en condiciones patológicas (Tu et al., 2010)	Aparece	DAPK-1 (Tu et al., 2010)
PDZ domain-containing protein				
<i>PDZ domain-containing protein GIPC1</i> (GIPC1)	Q9Z254	GIPC se une a NR2B extrasinápticos y regula su expresión en superficie (Yi et al., 2007)	2,600	NR2B (Yi et al., 2007), Myosin VI (Yi et al., 2007) (Yano et al., 2006)
Quinasas				
<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha</i> (CaMKII subunit alpha)	P11798	El estímulo excitotóxico incrementa la unión CaMKII-NR2B (Fan et al., 2014)	5,141	NR2B (Mao et al., 2014) (Sanz-Clemente et al., 2013) (Gardoni et al., 2006), CRMP2 (Hou et al., 2009)
<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta</i> (CaMKII subunit beta)	P08413		3,140	

<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta</i> (CaMKII subunit delta)	Q8CCM0	El estímulo excitotóxico incrementa la unión CaMKII-NR2B (Fan et al., 2014)	5,609	NR2B (Mao et al., 2014) (Sanz-Clemente et al., 2013) (Gardoni et al., 2006), CRMP2 (Hou et al., 2009)
<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma</i> (CaMKII subunit gamma)	P11730		3,881	
<i>CaM kinase-like vesicle-associated protein</i> (Camkv)	Q63092	No se ha descrito actividad quinasa asociada	4,396	-
<i>Protein Kinase C beta type</i> (PKC-B)	P68403	Fosforila a NR2B en Ser-1303 potenciando la función del canal NMDAR (Liao et al., 2001; Ramya et al., 2012)	Aparece	NR2B (Liao et al., 2001; Ramya et al., 2012), AP-2 (Chen et al., 2006), CX43 (Smyth et al., 2014)
Proteasas				
<i>Cathepsin B</i> (RSG-2)	P00787	Incrementa en respuesta a la isquemia y amplifica el proceso apoptótico (Anagli et al., 2008)	Aparece	DAPK-1 (Lin et al., 2007)
Chaperonas				
<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i> (HSP 84)	P11499	Promueve la estabilización y actividad de DAPK1 (Citri et al., 2006; Zhang et al., 2007a)	3,830	DAPK-1 (Citri et al., 2006; Zhang et al., 2007a)
<i>DnaJ homolog subfamily A member 2</i> (RDJ2)	O35824	Modula la señalización por proteína G (Rosales-Hernandez et al., 2009)	3,299	-
<i>DnaJ homolog subfamily B member 6</i> (DNAJB6)	Q6AYU3	Co-chaperona de HSC70, reduce agregados proteicos (Hussein et al., 2015)	Aparece	-
<i>DnaJ homolog subfamily A member 1</i> (DNAJA1)	P63037	Reduce agregados proteicos (Jana et al., 2000)	Aparece	-
Citoesqueleto				
<i>Myosin-10</i> (Myh10)	Q9JLT0	Función motora	5,901	Actina (Coles and Bradke, 2015)
<i>Myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle</i> (Myh9)	G3V6P7	Función motora	4,700	Actina (Coles and Bradke, 2015)
<i>Myosin-14</i> (Myh14)	Q6URW6	Función motora	3,042	Actina (Coles and Bradke, 2015)

<i>Myosin regulatory light chain RLC-A (Myosin RLC-A) or Myosin regulatory light chain 2-A</i>	P13832	La fosforilación por parte de DAPK1 provoca <i>membrane bebbing</i> (Kuo et al., 2003; Cohen et al., 1997; Bialik and Kimchi, 2004)	2,760	DAPK-1 (Kuo et al., 2003; Cohen et al., 1997; Bialik and Kimchi, 2004), Actina (Coles and Bradke, 2015)
<i>Plectin</i>	Q6S3A1	Función estructural – localización - señalización	3,278	Actina (Coles and Bradke, 2015)
<i>Fascin</i>	P85845	Función estructural – localización - señalización	2,810	Actina (Coles and Bradke, 2015)
<i>Nestin</i>	G3V8F8	Función estructural – localización - señalización	3,123	Dineína (Lepinoux-Chambaud and Eyer, 2013), Actina (Coles and Bradke, 2015)
Proteínas ribosomales				
<i>60S ribosomal protein L37a</i>	D4AAZ6	Participan en la síntesis proteica	Aparece	-
<i>60S ribosomal protein L17</i>	P24049	Participan en la síntesis proteica	Aparece	-
<i>40S ribosomal protein S27</i>	Q6ZWU9	Participan en la síntesis proteica	2,849	-
Otras proteínas				
<i>Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1 (Lrrfp1)</i>	Q66HF9	La MCAO incrementa la expresión de Lrrfp1 en el área periinfarto (Mallolas et al., 2006)	5,523	-
<i>Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2 (Lrrfp2)</i>	Q4V7E8	Importante en la vía de señalización Wnt (Liu et al., 2005)	4,455	-
<i>E3 ubiquitin-protein ligase HERC2</i>	Q4U2R1	Integra complejos de proteínas y actúa como puente entre diferentes vías celulares (Galligan et al., 2015)	Aparece	-
<i>Matrin-3</i>	P43244	Su fosforilación por PKA en condiciones patológicas contribuye a la muerte neuronal (Giordano et al., 2005)	Aparece	-

Tabla 11. Proteínas que desaparecen o disminuyen su asociación al Co-IP-DAPK1 tras la OGD/R en muestra total.

Proteína	Uniprot	Función molecular - Isquemia	Disminución (foldchange CT/OGD)	Interacción publicada con:
Quinasas				
<i>Mitogen-activated protein kinase kinasekinase 4 (MAP3K4)</i>	P97820	Media la activación de p38 MPK (Warr et al., 2012; Sapkota, 2013)	Desaparece	-
Fosfatasas				
<i>Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A</i>	Q10728	Regulador de PP1	Desaparece	-
<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform (PP2A-beta)</i>	P36876	Defosforila a NR2B y limita la sobreactivación de los NMDARs (Farinelli et al., 2012; Ramya et al., 2012) y activa DAPK1 al defosforilarla (Gozuacik et al., 2008; Widau et al., 2010)	Desaparece	NR2B (Farinelli et al., 2012; Ramya et al., 2012), DAPK-1 (Gozuacik et al., 2008)
Citoesqueleto				
<i>Actin 1 protein (Actn1)</i>	Q6GMN8	Estabilización, transporte, polaridad neuronal	7,642	DAPK-1 (Henshall et al., 2003; Bialik and Kimchi, 2004)
<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A</i>	Q99PD4	Unión a actina	3,547	Actina
<i>Actin-binding LIM protein 1 (abLIM-1)</i>	Q8K4G5	Organización del citoesqueleto	4,625	Actina
<i>Alpha-actinin-2</i>	Q9JI91	Unión de actina a estructuras intracelulares, como la subunidad NR2B (Wyszynski et al., 1997; Sattler et al., 2000)	5,488	NR2B y Actina (Sattler et al., 2000; Wyszynski et al., 1997)
<i>Alpha-actinin-4</i>	Q9QXQ0	Media la unión de actina a estructuras intracelulares	3,453	Actina
<i>Microtubule-associated protein 6 (MAP-6)</i>	Q63560	Estabilización de los microtúbulos	3,441	Microtúbulos (Gory-Faure et al., 2014)
<i>Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1</i>	G3V7G0	Transporte	6,004	Dinactina (Deng et al., 2010)
<i>Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2</i>	Q5D023	Transporte	3,421	Dinactina (Deng et al., 2010)

<i>Dynein light chain roadblock type-1</i>	P62627	Transporte	Desaparece	Dinactina (Deng et al., 2010)
<i>Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2 (Sptn2/Spna2)</i>	Q9QWN8	Mantiene la estabilidad y estructura de la membrana celular (Zhang et al., 2013a)	4,601	NR2B (Wechsler and Teichberg, 1998), Actina (Wechsler and Teichberg, 1998), Ankirina (Zhang et al., 2013a)
<i>Alpha-adducin</i>	Q63028	Se une a calmodulina, ensambla la red espectrina-actina	2,731	Actina (Xu et al., 2013)
<i>CLIP-associating protein 2</i>	Q99JD4	Estabilización de los microtúbulos	4,560	Tubulina (Galjart, 2005)
<i>CLIP-associating protein 1</i>	F1LNR1	Estabilización de los microtúbulos	5,022	Tubulina (Galjart, 2005)
<i>Clip1</i>	F1MAH8	Promueve el crecimiento de microtúbulos y localiza el complejo dineína-dinactina	Desaparece	Tubulina (Galjart, 2005)
<i>Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2</i>	P60521	Unión del receptor GABA _A a microtúbulos	3,800	-
Otras proteínas				
<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2 (CRMP-2/DRP-2)</i>	P47942	Promueve el crecimiento axonal (Fukata et al., 2002) y la internalización de la subunidad NR2B (Bretin et al., 2006; Brittain et al., 2011).	4,555	NR2B (Bretin et al., 2006; Brittain et al., 2011), Tubulin (Fukata et al., 2002), CamKII (Hou et al., 2009), PP1γ (Cid et al., 2007)
<i>Protein DDI1 homolog 2</i>	A2ADY9	-	6,902	Syntaxin 1B (uniprot)
<i>Glutaminase kidney isoform, mitochondrial</i>	P13264	Componente potencial de la neurotoxicidad durante la inflamación (Ye et al., 2013)	2,542	-
<i>Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15</i>	P11031	Regulador de la transcripción	Desaparece	-

De las 49 proteínas identificadas como alteradas por la OGD/R en el Co-IP-DAPK1 en el análisis proteómico de muestra total, 15 proteínas habían sido previamente descritas por otros estudios asociadas a DAPK1 o a la subunidad NR2B de los NMDARs (ver última columna de las Tablas 10 y 11). La obtención de proteínas previamente descritas asociadas a NR2B, confirmaba que la Co-IP-DAPK1 permite la obtención de proteínas implicadas en la vía de señalización de los NMDAR-NR2B.

Entre las proteínas que aparecieron o incrementaron su Co-IP con DAPK1 tras la OGD/R30min, encontramos la subunidad NR2B de los NMDARs, esperable según lo descrito previamente en la bibliografía. Aparte de constituyentes del citoesqueleto y proteínas ribosomales se identificaron también varias quinasas como CaMKII y PKC, la proteína GIPC y la proteasa Cathepsin B entre otras. El efecto de la isquemia descrito en la bibliografía incrementando el reclutamiento de DAPK1 al complejo NR2B, predice que el uso de DAPK1 como cebo en la inmunoprecipitación, resultará en la mayor obtención de NR2B y de las moléculas que interaccionen con esta subunidad, como podrían ser PKC, CaMKII y GIPC en las muestras OGD/R. En este sentido, se observó que, efectivamente, la OGD/R induce un incremento de la asociación de CaMKII, PKC y GIPC al complejo DAPK1-NR2B.

Entre las proteínas que desaparecieron o redujeron su Co-IP con DAPK1 en situaciones de OGD/R30min, se identificaron proteínas de citoesqueleto, fosfatasas como PP1 o PP2A, y otras proteínas como la dihydropyrimidinase-related protein 2 (CRMP2).

Del total de proteínas diferenciales identificadas en el Co-IP-DAPK1 en muestra total, observamos que las funciones moleculares de unión y catalítica están presentes tanto entre las proteínas que incrementan o aparecen como entre las que disminuyen o desaparecen. Destaca la aparición de receptores y transportadores, el incremento y aparición de proteínas quinasas, así como la disminución de fosfatasas (Figura 52).

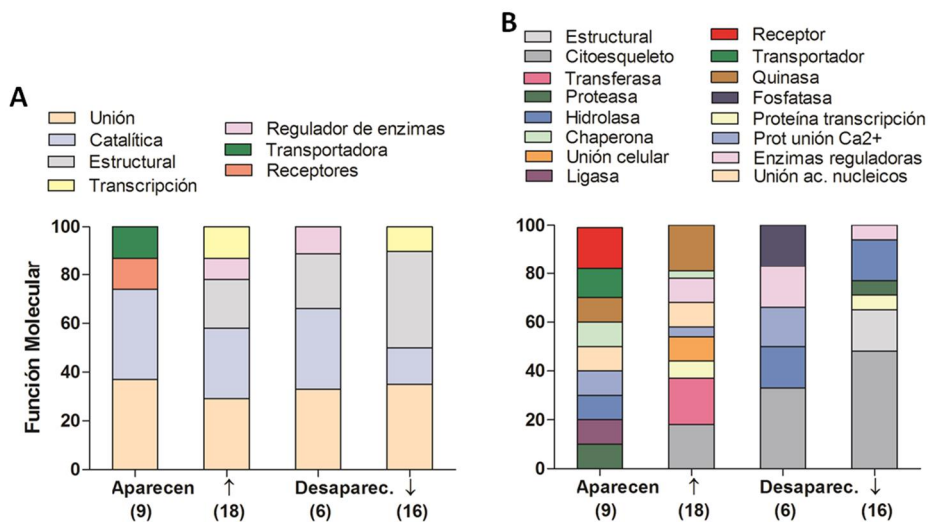


Figura 52. Gráficos que representan las funciones moleculares (A) y clases de proteínas (B) más frecuentes entre las proteínas diferenciales identificadas en el Co-IP-DAPK1 de muestra total.

11.3.2. Análisis de las proteínas identificadas por LC-MS/MS con presencia diferencial en el Co-IP-DAPK1 de muestra de membrana

Seguidamente, se analizó mediante espectrometría de masas el complejo de proteínas obtenido en la Co-IP-DAPK1 de muestras de membrana. Se identificaron un total de 71 proteínas con al menos dos péptidos únicos. Hallamos veintitrés proteínas cuyos niveles diferían en >2.5 veces entre los cultivos control y los sometidos a OGD/R. De estas proteínas, 1 estaba incrementada, 6 aparecían, 2 disminuían y 14 desaparecían en condiciones OGD/R30min (Tablas 12 y 13).

Tabla 12. Proteínas que aparecen o incrementan su asociación en el Co-IP-DAPK1 tras la OGD en muestra de membrana.

Proteína	Uniprot	Función molecular - Isquemia	Incremento (foldchange OGD/CT)	Interacción publicada con:
Chaperonas				
<i>Chaperonin subunit 8</i> (Protein Cct8)	D4ACB8	Regula la apoptosis neuronal en neuronas tras daño cerebral traumático (Wu et al., 2015)	Aparece	
Citoesqueleto/ estruct				
<i>Neurofilament light polypeptide</i> (NF-L)	P19527	Función estructural - localización - señalización	3,483	Dineína (Lepinoux-Chambaud and Eyer, 2013) , α-internexina (Yuan et al., 2006) , Actina (Coles and Bradke, 2015)
Otras proteínas				
<i>Dihydropyrimidinase-related protein 1</i> (CRMP-1/DRP-1)	Q62950	Promueve el crecimiento axonal (Higurashi et al., 2012). Podría intervenir en la muerte neuronal tras la isquemia cerebral (Jiang et al., 2007)	Aparece	Tubulina (Yamashita et al., 2013)
<i>Syntaxin-1B</i>	P61265	Incrementa tras la isquemia en zonas donde se ha perdido la expresión de MAP2	Aparece	-
<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	P05065	Enzima catalítica de la glicólisis	Aparece	-
<i>Protein Atp6v1a</i>	D4A133	Subunidad A de la ATPase/H ⁺	Aparece	-
<i>Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial</i>	O35796	Proteína multifuncional	Aparece	-

Tabla 13. Proteínas que desaparecen o disminuyen su asociación al Co-IP-DAPK1 tras la OGD/R en muestra de membrana.

Proteína	Uniprot	Función molecular - Isquemia	Disminución (foldchange CT/OGD)	Interacción publicada con:
Chaperonas				
<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSP-60)</i>	P63039	Ensamblaje y plegamiento de proteínas mitocondriales (Chen Y 2014)	3,327	-
Citoesqueleto				
<i>Tubulin beta-5 chain</i>	P69897	Ensamblaje de microtúbulos	Desaparece	Actina (Baas, 1997)
<i>Unconventional Myosin-Va</i>	Q99104	Función motora	Desaparece	Actina (Coles and Bradke, 2015)
<i>Microtubule-associated protein 6 (MAP-6)</i>	Q63560	Estabilización de los microtúbulos	Desaparece	Microtúbulos (Gory-Faure et al., 2014)
<i>Microtubule-associated protein 4 (MAP-4)</i>	Q5M7W5	Estabilización de los microtúbulos	Desaparece	Microtúbulos (Chapin and Bulinski, 1994)
<i>CLIP-associating protein 2</i>	Q99JD4	Estabilización de los microtúbulos	Desaparece	Tubulina (Galjart N 2005)
<i>Prohibitin-2</i>	Q5XIH7	Neuroprotección, involucrada en tolerancia isquémica (Zhou et al., 2012)	3,153	-
<i>Myristolated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS)</i>	P26645	Sustrato de PKC, se une a actina, calmodulina y sinapsina	Desaparece	Citoesqueleto (Alli et al., 2015)
Proteínas Ribosomales				
<i>60S ribosomal protein L12</i>	P23358	Participan en la síntesis proteica	Desaparece	
<i>60S ribosomal protein L31</i>	P62902	Participan en la síntesis proteica	Desaparece	
Complejo AP-2				
<i>AP-2 complex subunit beta</i>	P62944	La interacción NR2B-AP2 conduce a la internalización del	Desaparece	NR2B (Zhang et al., 2008; Lavezzari et al., 2003; Prybylowski et

		receptor		<i>al., 2005)</i>
Otras proteínas				
<i>Polyubiquitin-B</i>	P0CG49	Señalización y activación de quinasas	Desaparece	-
<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (VDAC-2)</i>	P81155	Canal de membrana mitocondrial	Desaparece	-
<i>Vesicle-trafficking protein SEC22b</i>	O08547	Transporte Golgi-RE	Desaparece	-
<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 2</i>	P32551	Participa en la cadena respiratoria mitocondrial	Desaparece	-
<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2</i>	Q6PIE5	Cataliza la hidrólisis de ATP acoplado al intercambio Na ⁺ /K ⁺ a través de la membrana celular	Desaparece	-

De las 23 proteínas identificadas alteradas por la OGD/R30min en el Co-IP-DAPK1 de muestras de membrana, una proteína (AP-2) había sido previamente descrita en la bibliografía interactuando con la subunidad NR2B de los NMDARs (ver última columna de las Tabla 13).

Entre las proteínas que aparecieron o incrementaron su Co-IP con DAPK1 tras la OGD/R30min, se identificaron componentes del citoesqueleto, una chaperona (Cct8) y otras proteínas como la dihydropyrimidinase-related protein 1 (CRMP1) o Syntaxin-1B; cabe destacar que se había descrito previamente en la bibliografía la interacción de dihydropyrimidinase-related protein 2 (CRMP2) con NR2B y la interacción de syntaxin-1A con DAPK1. Otras proteínas como la chaperona HSP-65, la subunidad beta del complejo de internalización AP-2 desaparecieron o redujeron su asociación al complejo DAPK1 en condiciones de OGD/R.

Del total de proteínas diferenciales identificadas en la Co-IP-DAPK1 de muestras de membrana tras la OGD/R, destaca la aparición de función receptora y la desaparición de enzimas reguladoras. Respecto a las clases de proteínas destacó

la aparición de receptores, así como la disminución de enzimas reguladoras, proteasas y proteínas de unión celular (Figura 53).

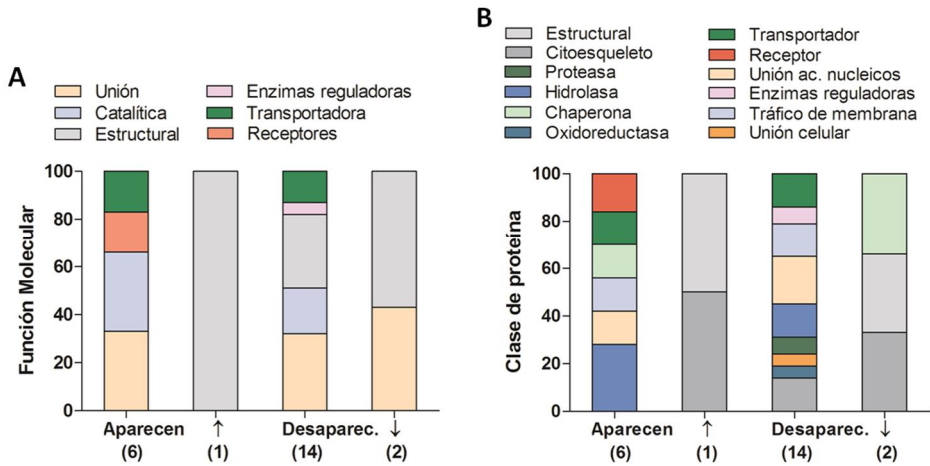


Figura 53. Gráficos que representan las funciones moleculares (A) y clases de proteínas (B) más frecuentes entre las proteínas diferenciales identificadas en la Co-IP-DAPK1 de muestra de membrana plasmática.

En el estudio LC-MS/MS realizado a partir de muestra de membrana, no se identificaron péptidos de NR2B. Sin embargo, sí se determinó por WB la presencia incrementada de la subunidad NR2B (tanto niveles totales como la banda proteolizada de 115KDa) en el Co-IP-DAPK1 obtenido de muestra de membrana tras la OGD/R (Figura 54).

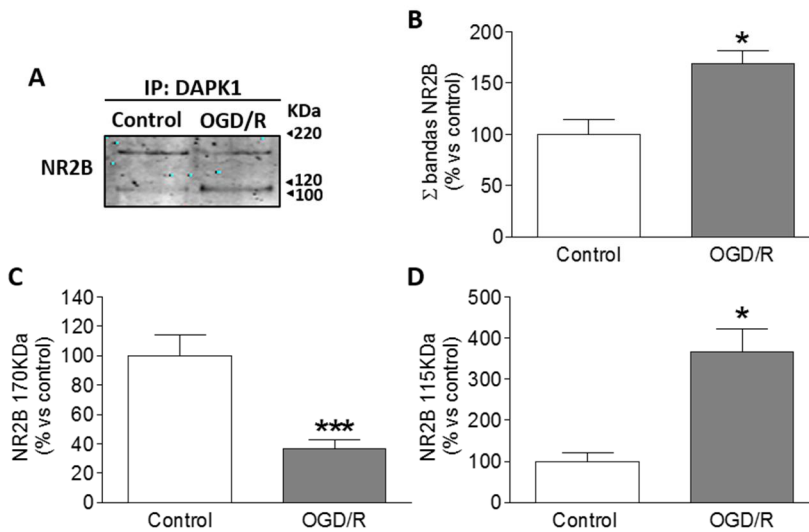


Figura 54. Demostración por WB de la presencia de la subunidad NR2B en el Co-IP-DAPK1 de muestras de membrana plasmática. A) WB representativo de la subunidad NR2B Co-IP con DAPK1. Se cuantificaron las bandas (o la suma de las bandas) correspondientes a NR2B. Los gráficos muestran la cuantificación de la suma de las bandas correspondientes a NR2B (B), a NR2B de 170KDa (C) y NR2B de 115KDa (D) en condiciones control o de OGD/R. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. $n = 3$ experimentos independientes.

La inmunoreactividad detectada para NR2B en el Co-IP-DAPK1 de estas muestras de membrana era débil, sugiriendo que los niveles proteicos de NR2B presentes en el inmunoprecipitado eran bajos. Esto explicaría por qué no se consiguió detectar esta proteína mediante LC-MS/MS.

11.3.3. Validación por WB de los resultados del estudio proteómico de muestra total por LC-MS/MS para 3 proteínas: NR2B, GIPC y CaMKII

Finalmente, se validaron por WB los resultados obtenidos por LC-MS/MS para NR2B, GIPC y CaMKII. Los niveles totales de NR2B en el Co-IP-DAPK1 fueron significativamente más altos tras someter los cultivos a OGD/R en comparación con las condiciones control (Figura 55A, B). Respecto a GIPC, se determinó un incremento en su Co-IP con DAPK1 tras la OGD/R (Figura 55A, C). También se

realizó la validación de una de las proteínas cuya presencia en el complejo se observaba más alterada tras la OGD/R y que se había descrito previamente en la bibliografía (Gardoni et al., 2006) asociada a los receptores de NMDA, la proteína CaMKII. Los resultados de LC-MS/MS mostraron un elevado incremento de las 4 subunidades catalíticas de esta quinasa (Tabla 9). La validación mediante WB mostró un incremento de la CaMKII tras la OGD/R, validando así los datos proteómicos obtenidos (Figura 55A, D).

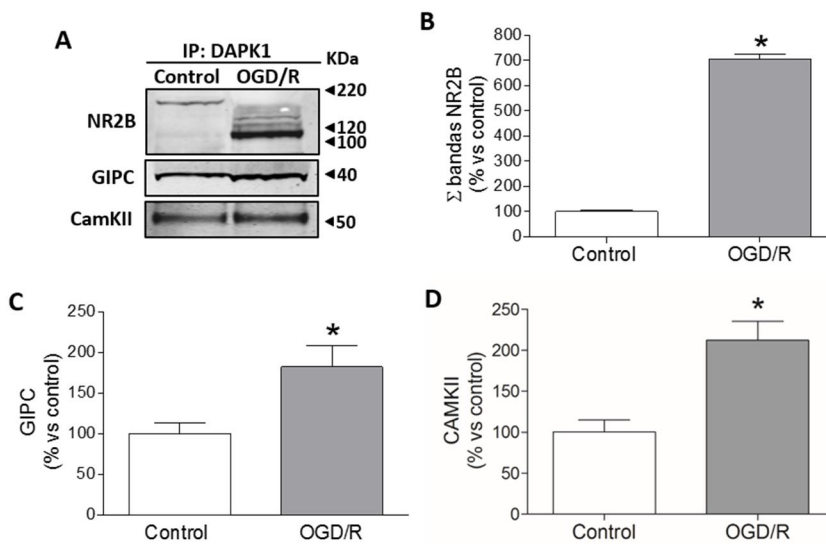


Figura 55. Validación por WB de los resultados del estudio proteómico por LC-MS/MS para 3 proteínas: NR2B, GIPC y CaMKII. A) WB representativos de las proteínas NR2B, GIPC y CaMKII en el Co-IP-DAPK1 de muestra total. Los gráficos muestran la cuantificación de la suma de las bandas correspondientes a NR2B (**B**) y la cuantificación de las proteínas GIPC (**C**) y CaMKII (**D**). * $p < 0,05$ respecto al control. $n = 3$ experimentos independientes.

DISCUSIÓN

La activación patológica de los NMDARs, con la consiguiente desregulación del calcio intracelular, constituye la primera causa de muerte neuronal inducida por la isquemia (Arundine and Tymianski, 2004). Sin embargo, la actividad normal de estos receptores es crucial para la supervivencia y correcta funcionalidad de las neuronas. Lo que determina si la actividad de los NMDARs es neuroprotectora o inductora de muerte excitotóxica es la magnitud de la activación y la localización de los receptores (Hardingham, 2006a; Hardingham, 2006b; Zhou et al., 2015b). Estímulos de baja intensidad (fisiológicos) activan NMDARs sinápticos, compuestos principalmente por la subunidad NR2A, mientras que estímulos de elevada intensidad (patológicos) activan NMDARs extrasinápticos, mayoritariamente formados por NR2B (Tovar and Westbrook, 1999; Hardingham et al., 2002; Vizi et al., 2013). Si bien recientemente ha suscitado cierta discusión, la hipótesis más aceptada actualmente es que los NMDARs sinápticos y extrasinápticos presentan efectos opuestos; la entrada de calcio a través de NMDARs sinápticos dispara cambios transcripcionales que median neuroprotección mientras que los extrasinápticos activan la cascada excitotóxica (Hardingham and Bading, 2002). En este sentido, se ha demostrado que la activación de NMDARs sinápticos promueve la actividad de CREB mientras que la activación de NMDARs extrasinápticos inactiva la señal de CREB induciendo la rápida defosforilación de este factor de supervivencia celular (Hardingham et al., 2002; Chen et al., 2008; Hardingham and Bading, 2010). En este trabajo, debido a la importancia de estos receptores en la fisiopatología de la isquemia cerebral, nos hemos centrado en la intervención sobre la señalización de los NMDARs, promoviendo en primer lugar la intervención específica sobre los receptores de NMDA sinápticos.

PARTE 1: Intervención sobre NMDARs sinápticos: Efecto sobre el factor de supervivencia CREB

Los resultados presentados demuestran que incluso una activación corta de NMDARs sinápticos promueve la expresión de pCREB tanto en las neuronas piramidales excitadoras (<10 μm de diámetro) como en las neuronas de subtipo GABAérgico (>10 μm de diámetro) presentes en nuestros cultivos de neuronas corticales. Estudios publicados previamente habían determinado la disminución de la fosforilación de CREB en neuronas hipocampales sometidas a OGD, mediada por la activación de NMDARs extrasinápticos (Hardingham and Bading, 2002). Por otro lado, varios estudios habían demostrado que la activación de NMDARs-NR2A sinápticos, previa a la OGD/R *in vitro* o al evento isquémico *in vivo*, incrementa los niveles de pCREB, incremento que se asoció a una mayor resistencia al daño neuronal producido por un evento isquémico posterior (Chen et al., 2008; Terasaki et al., 2010). En el presente trabajo, hemos demostrado que la activación de NMDARs sinápticos, y la consiguiente activación de pCREB, es efectiva también cuando se produce al finalizar el período de OGD; triplicando el número de neuronas que expresan pCREB y protegiéndolas del daño inducido por OGD/R.

En base a los antecedentes y a los resultados presentados, podemos considerar a pCREB como un factor de supervivencia crucial durante la isquemia cerebral. Por este motivo se decidió estudiar, de entre los fármacos que hallamos en el mercado, un posible tratamiento que estimulara la señalización de CREB al administrarse dentro de la ventana terapéutica, una vez que el evento isquémico ha tenido lugar. Varios estudios han determinado que el tratamiento con algunas estatinas incrementa la señalización de CREB o la actividad de las proteínas quinasas que lo regulan (Bell and Yellon, 2003; Prinz et al., 2008; Prakash et al., 2011). Se ha demostrado que la administración de simvastatina previa a la isquemia incrementa la expresión de pCREB en cerebros de rata (Carloni et al., 2009) y que la administración crónica de lovastatina en ratas isquémicas promueve la activación de CREB (Huo et al., 2014). Los beneficios del tratamiento con estatinas cuando se administran tras el evento isquémico han sido atribuidos

a varios mecanismos, incluyendo entre otros efectos antioxidantes o antiinflamatorios. Sin embargo, hasta el momento no se ha determinado el efecto sobre la fosforilación de CREB cuando la administración de estatinas se produce tras la isquemia. Tampoco la posible utilidad del tratamiento con estatinas como neuroprotector a través de CREB en neuronas previamente expuestas a OGD/R. A este respecto, hasta dónde sabemos, existe solamente un estudio *in vitro* que demuestra que la administración de rosuvastatina tras la OGD protege a las neuronas en cultivo (Savoia et al., 2011), aunque no determinan el papel de CREB en esta neuroprotección. Teniendo en cuenta estos datos y el hecho de que los pacientes tratados con ATV tras la isquemia presentan un mejor pronóstico al compararlos con los tratados con simvastatina (Lampl et al., 2010), se decidió estudiar el papel de ATV y su principal metabolito o-ATV en la protección de cultivos de neuronas corticales sometidas a OGD/R.

Hemos determinado que la OGD/R reduce los niveles de pCREB en cultivos de neuronas corticales, coincidiendo con algunos de los estudios publicados previamente (Hardingham and Bading, 2002; Bell et al., 2013) pero no con todos ellos (Terasaki et al., 2010; Sasaki et al., 2011; Choi et al., 2013). Las discrepancias podrían ser debidas a diferencias en los tiempos de los procedimientos utilizados, al porcentaje de neuronas GABAérgicas presentes en los diferentes cultivos y/o a la severidad del protocolo de OGD utilizado (letal/subletal-penumbra).

El presente trabajo ha demostrado que la administración de o-ATV al inicio de la fase R, pero no la de la molécula original ATV, incrementa los niveles de pCREB en cultivos de neuronas corticales. En condiciones control, se observó que la mayoría de las neuronas que expresan pCREB son neuronas GABAérgicas. Este subtipo neuronal constituye el 20% de las neuronas presentes en el cultivo, lo cual concuerda con lo reportado en la bibliografía (Kato-Negishi et al., 2004; Kinney et al., 2006), y aproximadamente la mitad de ellas expresan pCREB en condiciones control, lo que supone la expresión de pCREB en 1 de cada 10 neuronas del cultivo. Estos resultados estarían de acuerdo con la débil inmunoreactividad para pCREB reportada en cultivos neuronales en trabajos previos (Lee et al., 2005;

Meller et al., 2005). En cultivos sometidos a OGD/R1h, hemos determinado que la administración de o-ATV al inicio de la fase R, incrementa la expresión de pCREB específicamente en estas neuronas GABAérgicas, pasando de un 53% de neuronas GABAérgicas positivas para pCREB a un 96% tras 1 hora de tratamiento con o-ATV.

El análisis del efecto del tratamiento con ATV u o-ATV sobre la muerte neuronal inducida por OGD/R demuestra que la administración de o-ATV al inicio de la fase R reduce en un 20% la muerte neuronal a las 24 h de R; esta reducción de la mortalidad estaría de acuerdo con la protección de las neuronas GABAérgicas del cultivo (que corresponden al 20% del total de neuronas). Sin embargo, no se ha observado efecto del tratamiento con ATV sobre la muerte neuronal inducida por OGD/R. La falta de protección de ATV observada está en consonancia con el estudio de Bosel J y cols. en el que no observaron protección sobre cultivos corticales tratados con ATV durante los 4 días previos a la exposición a OGD (Bosel et al., 2005). Por otro lado, el estudio realizado por Vandresen-Filho sí mostró efecto protector de ATV en cortes hipocampales obtenidos de ratas tratadas con ATV durante 10 días y posteriormente sometidos a OGD (Vandresen-Filho et al., 2013). Por las características de la preparación de Vandresen-Filho, se descarta un posible efecto vasodilatador o antiinflamatorio sistémico de ATV en la protección observada en los cortes de hipocampo expuestos a OGD. En cambio, se puede asociar la protección obtenida a un efecto directo sobre las células presentes en los cortes de hipocampo de ATV o de sustancias resultantes de su metabolismo, como o-ATV, que hubiesen conseguido alcanzar el cerebro del animal *in vivo*. En conjunto, los antecedentes existentes y los resultados obtenidos en el presente estudio, sugieren que la ATV requeriría ser metabolizada para poder ejercer su efecto neuroprotector frente a la cascada de eventos disparados en las neuronas por la OGD/R, y por ello no es protectora frente OGD/R en ensayos *in vitro*. Esta afirmación se vé reforzada por estudios publicados que demuestran que tras la administración, ATV es rápidamente metabolizada en el hígado mediante el citocromo CYP3A4, generando dos metabolitos activos, el principal de los cuales es o-ATV (Black et al., 1999; Jacobsen et al., 2000; Lennernas, 2003; Lau et al.,

2006; Lins et al., 2003). Además, los metabolitos son los responsables del 70% de la actividad del fármaco (Lea and McTavish, 1997; Kantola et al., 1998).

Tras 1h de fase R, la OGD/R redujo el número de núcleos neuronales totales en el cultivo e incrementó el porcentaje de neuronas GABAérgicas. Estos datos indican que el subtipo neuronal GABAérgico sería más resistente a OGD/R que las neuronas excitadoras, tal y como se había demostrado previamente en cultivos de neuronas estriatales, que son especialmente ricos en neuronas de fenotipo GABAérgico (Kaufman et al., 2012). Además, la administración de o-ATV al inicio de R incrementó la resistencia de las neuronas GABAérgicas a la muerte excitotóxica inducida por OGD/R medida tras 1h de R sin alterar el porcentaje de neuronas GABAérgicas en cultivos control. Este efecto protector de o-ATV sobre el subtipo GABAérgico está en consonancia con un trabajo reciente que muestra que el tratamiento con ATV tras la isquemia *in vivo*, previene de la disminución de GAD producida en el *globus pallidus* en un modelo de ictus en rata (Sabogal et al., 2014). Estos resultados, demuestran un efecto específico de o-ATV sobre pCREB en neuronas GABAérgicas que se acompaña de una mayor resistencia de este tipo neuronal frente a la muerte inducida por OGD/R. Esta mayor actividad de la señalización a pCREB característica de las neuronas GABAérgicas, podría contribuir a explicar la resistencia de este subtipo neuronal al estrés celular provocado por nuestro modelo de daño excitotóxico OGD/R.

Determinamos también que tanto ATV como o-ATV bloqueaban la producción del producto de la peroxidación lipídica 4-HNE inducido por OGD/R, de manera que el potencial neuroprotector específico de o-ATV en neuronas GABAérgicas no está mediado por su mayor perfil antioxidante previamente reportado (Mason, 2006 ;Mason et al., 2006). Además, la reducción de los niveles de 4-HNE no solamente se producía en neuronas GABAérgicas sino también en las neuronas piramidales excitadoras de nuestros cultivos que no son protegidas por o-ATV. Por ello, podemos concluir que la inhibición del daño oxidativo lipídico inducido por

OGD/R no es suficiente para mediar la neuroprotección específica otorgada por el tratamiento con o-ATV a neuronas GABAérgicas presentes en cultivos corticales.

En este punto nos planteamos si una mayor presencia de los NMDARs en la sinapsis de las neuronas GABAérgicas de nuestros cultivos podría suponer una mayor señalización sináptica de los NMDAR que promoviera la señalización prosupervivencia a través de CREB. Se observó que en las neuronas GABAérgicas prácticamente la totalidad de NMDARs-NR2A y una gran parte de los NMDARs-NR2B colocalizaban con el marcador sináptico neurologina, lo que indica que se hallan en la sinapsis. En cambio, en las neuronas piramidales excitadoras no se observó colocalización de los NMDARs-NR2B con el marcador de sinapsis. Nuestros resultados están en la línea de lo reportado por Kinney y cols. que mostraron que uno de los subtipos de neuronas GABAérgicas (interneuronas positivas para parvalbumina) presentaban un ratio NR2A/NR2B más elevado que las neuronas piramidales. Además, estos autores describieron que en este tipo neuronal específico, la activación de los NMDARs-NR2A es necesaria para la señalización a través de pCREB (Kinney et al., 2006).

En conjunto, los resultados presentados en esta primera parte de la tesis doctoral, demuestran que: 1) la activación selectiva de NMDARs sinápticos tras la OGD incrementa rápidamente los niveles de pCREB y protege a las neuronas corticales en cultivo frente al daño inducido por OGD/R. 2) el tratamiento con o-ATV administrado al inicio de la reperusión incrementa pCREB en un subtipo específico neuronal, las neuronas GABAérgicas que, como hemos mostrado, presentan abundancia de NMDARs sinápticos, y las protege de la muerte inducida por OGD/R.

Nuestros resultados sugieren que la abundancia de NMDARs sinápticos de las neuronas GABAérgicas podría ser la responsable del efecto neuroprotector de o-ATV en este subtipo neuronal. Esta neuroprotección inducida por o-ATV en neuronas GABAérgicas podría tener una gran repercusión en los circuitos neuronales *in vivo* en las primeras horas postisquemia, preservando los circuitos

de señal inhibitoria que contrarrestan el exceso de señalización excitadora que conduce a excitotoxicidad en la isquemia cerebral. Por tanto, la supervivencia de estas neuronas inhibitorias en la penumbra del tejido cerebral isquémico podría prevenir la difusión de las ondas excitadoras que finalmente producen la liberación prolongada y excesiva de glutamato y el daño excitotóxico. Por ello, o-ATV podría ser un tratamiento neuroprotector a validar en estudios preclínicos en modelos animales de ictus. De ser validado, o-ATV podría ser un buen candidato para iniciar estudios clínicos debido a su perfil de seguridad.

PARTE 2: Intervención sobre NMDAR extrasinápticos

Para los NMDARs sinápticos, principalmente formados por la subunidad NR2A, se han descrito un gran número de proteínas asociadas, formando lo que se denomina densidad postsináptica (Okabe, 2007). Por paralelismo, suponemos que debe existir también complejidad por debajo de los NMDARs extrasinápticos ricos en subunidades NR2B. Sin embargo, hasta el momento poco se conoce de los efectores intracelulares implicados en la señalización hacia muerte neuronal de estos receptores NMDARs-NR2B. Se han descrito solamente dos moléculas, DAPK1 y GIPC, con unión específica o preferente al extremo C-terminal de la subunidad NR2B de los NMDARs y que no se unen a la subunidad NR2A. En el presente trabajo hemos coimmunoprecipitado (Co-IP) los complejos proteicos o interactoma de estas dos moléculas utilizando anticuerpos específicos para DAPK1 y GIPC, con el objetivo de identificar posibles candidatos sobre los que actuar para impedir la muerte inducida por los NMDARs-NR2B en la isquemia cerebral.

La Co-IP realizada con anticuerpo anti-DAPK1 (Co-IP-DAPK1) ha funcionado correctamente, tal y como indicó la presencia de las bandas de DAPK1 en el WB y la ausencia de señal DAPK1 en el inmunoprecipitado obtenido con anticuerpo no específico. Además, en muestra total hemos coimmunoprecipitado con DAPK1 la subunidad NR2B, previamente descrita como molécula que interacciona con

DAPK1 y también se han coimmunoprecipitado las proteínas PSD95 y GIPC, ambas descritas previamente unidas a NMDARs. La Co-IP-DAPK1 también funcionó correctamente a partir de muestra de membrana plasmática. En este caso también observamos por WB la Co-IP de NR2B y PSD95, que sabemos están localizados mayormente en la membrana, pero no para GIPC que se encuentra localizado mayormente en citosol.

En el caso de Co-IP-GIPC, se obtuvo por WB una banda de GIPC muy débil y no se observó la Co-IP esperada con NR2B, con ninguno de los 2 anticuerpos anti-GIPC utilizados. En base a estos resultados se decidió restringir el estudio al interactoma de DAPK1 dado que: 1) la técnica de Co-IP resultó mucho más eficiente con el anticuerpo anti-DAPK1 que con el anticuerpo anti-GIPC y 2) la Co-IP-DAPK1 arrastró también GIPC y, por tanto, también parte del interactoma proteico asociado a GIPC.

Trabajos previos habían determinado que la isquemia incrementaba la proteólisis tanto de NR2B en su extremo C-terminal intracelular como de DAPK1 (Guttmann et al., 2001; Araki et al., 2004; Shamloo et al., 2005; Gascon et al., 2008; Xu et al., 2009). En base a estos antecedentes, hemos evaluado el alcance del efecto de la OGD/R sobre la fosforilación y proteólisis de nuestra proteína cebo DAPK1 y de la proteína a coimmunoprecipitar, NR2B. En relación a la proteólisis de NR2B, tal como ya se había descrito previamente (Simpkins et al., 2003; Dong et al., 2004; Gascon et al., 2008), nuestro modelo de OGD/R provocó la disminución del 30% de la banda de 170KDa acompañada de un incremento del 40% de la banda de 115KDa, pero sin afectar a los niveles totales de NR2B. Para NR2A, se ha descrito que en experimentos *in vitro* la calpaína corta la región C-terminal de la subunidad en los aa 1279 y 1330 (Guttmann et al., 2001). Sin embargo, en el caso de la subunidad NR2B se sugirió mediante predicciones que el corte podría producirse en el aa 1030 (Simpkins et al., 2003) (Figura 56A), aunque ningún trabajo ha demostrado el lugar de corte en esta subunidad. Con estos datos, no se podía asegurar a qué altura del extremo C-terminal de NR2B actúa la calpaína y, por tanto, no podíamos prever las proteínas que perderían su interacción con

NR2B tras la proteólisis. Sin embargo, sí se había demostrado previamente que la isquemia activa DAPK1 (Schumacher et al., 2002a; Shamloo et al., 2005) e incrementa su asociación con el complejo NMDAR-NR2B, fosforilando a NR2B en el residuo Ser-1303 e incrementando así la conductividad de calcio a través del canal NMDAR (Tu et al., 2010). En este sentido, la Co-IP-DAPK1 de muestra de membrana mostró que aproximadamente el 50% de la subunidad NR2B se encuentra intacta y un 50% presenta el extremo C-terminal truncado, aunque prácticamente la totalidad de los NR2B están truncados en muestra total (Figura 51J). Los resultados presentados en esta tesis demuestran que DAPK1 interacciona con NR2B incluso cuando un porcentaje importante de NR2B ha sufrido proteólisis. Una posible explicación implicaría que el lugar de unión a DAPK1 quedase preservado en la subunidad NR2B proteolizada y que el corte por calpaína tuviera lugar por debajo del aa 1303, quizás en zonas similares a las descritas para NR2A (Figura 56B). Sin embargo, no podemos descartar que nuestros resultados indiquen la coexistencia de subunidades NR2B con su dominio C-terminal proteolizado con subunidades NR2B con el dominio C-terminal completo formando tetrámeros en un mismo receptor NMDA (Figura 56C) que, por tanto, precipitarían conjuntamente en el complejo Co-IP-DAPK1 (Figura 56C).

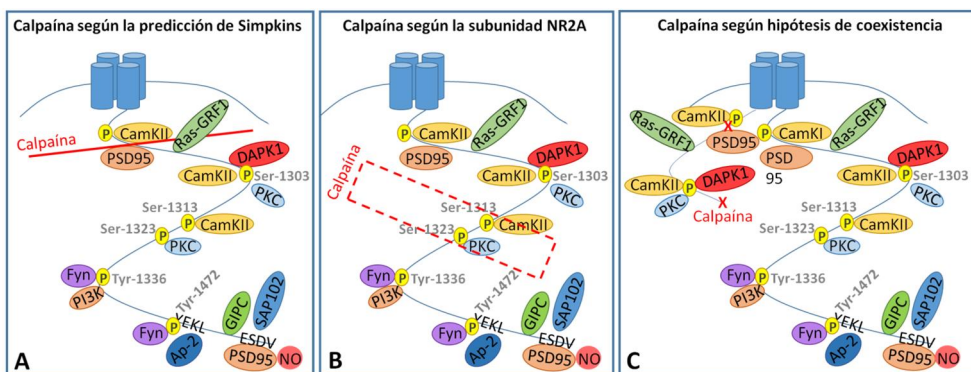


Figura 56. Esquema de los posibles modelos existentes respecto a la proteólisis del extremo C-terminal de la subunidad NR2B. A) Modelo por predicción desarrollado por Simpkins (Simpkins et al., 2003) . B) Modelo de proteólisis del extremo C-terminal de NR2B en base al punto de corte descrito para la subunidad NR2A. C) Modelo de coexistencia en un NMDAR de una subunidad NR2B con el extremo C-terminal proteolizado y otra intacta.

Todavía no se ha determinado de forma clara si esta proteólisis afecta a la función de los NMDARs. Algunos trabajos indican una afectación en las funciones de NMDAR-NR2B proteolizados (Wu et al., 2005; Yuen et al., 2008), mientras que otros sugieren que estos NMDARs proteolizados se mantienen en la membrana y presentan las mismas propiedades electrofisiológicas que los receptores nativos (Guttmann et al., 2001; Simpkins et al., 2003; Dong et al., 2004; Gascon et al., 2008). Sí parece estar más claro que el extremo C-terminal es indispensable para la correcta modulación de la función de los NMDARs. Así, la proteólisis de NR2B por calpaína no sería degradativa sino que crearía subunidades NR2B que ya no estarían controladas por moduladores como CaMKII, PSD95, PKC, Fyn, AP-2, GIPC o NOs, que se unan al extremo C-terminal de NR2B más allá del punto de corte por calpaína (Sprengel et al., 1998; Wu et al., 2007; Guttmann et al., 2001).

Respecto a DAPK1, su actividad está controlada por un doble sistema de bloqueo; fosforilación en el residuo Ser-308 y la unión de CaM. Cuando el residuo Ser-308 está fosforilado, bloquea el sitio activo de DAPK1 inactivándola. La defosforilación del residuo Ser-308 permite la unión de CaM a su dominio de unión, provocando un cambio conformacional de DAPK1 dejando accesible el sitio activo de DAPK1 dando lugar a una DAPK1 activa (Shohat et al., 2001; Velentza et al., 2002; de Diego et al., 2010). Debido a que la defosforilación de DAPK1 se considera un marcador importante de la activación de DAPK1 (Bialik and Kimchi, 2006), investigamos el efecto de OGD/R sobre los niveles de DAPK1 fosforilada en Ser308 (pS³⁰⁸-DAPK1) en nuestros cultivos de neuronas corticales. Se observó de forma clara que la OGD/R30min reduce la fosforilación en Ser-308 de DAPK1, de forma similar a lo descrito previamente en la bibliografía (Shamloo et al., 2005; Tu et al., 2010) indicando así la activación de DAPK1 en condiciones de OGD/R. Tanto en condiciones control como OGD/R, solamente detectamos por WB con anticuerpo anti-pS³⁰⁸-DAPK1 la banda de 160KDa correspondiente a pDAPK1. Sabemos que la OGD/R induce la proteólisis de DAPK1 mediada por catepsina B en los aa 836-947, así el anticuerpo anti anti-pS³⁰⁸-DAPK1 tendría que reconocer también las bandas de 115-120 correspondientes a la forma truncada si esta siguiera fosforilada. La

no detección de las bandas proteolizadas parece indicar que la forma truncada habría sufrido también desfosforilación. Por tanto, la OGD/R induce una defosforilación casi completa de DAPK1.

En relación a los niveles de la proteína DAPK1 y su proteólisis, determinamos que los niveles totales de DAPK1 en el homogenado neuronal permanecían inalterados y que la OGD/R inducía procesamiento proteolítico de DAPK1 reduciendo la forma de 160KDa y generando otras de 120-100KDa. Este marcado procesamiento proteolítico de DAPK1 en neuronas expuestas a tiempos largos de OGD ya había sido descrito anteriormente por Shamloo y cols. (Shamloo et al., 2005) pero no en el trabajo de Tu y cols. (Tu et al., 2010) en que trabajaban con una exposición máxima a OGD de 30 min y en el que describen el reclutamiento de DAPK1 al extremo C-terminal de NR2B pero sin indicios de proteólisis. Está ampliamente aceptado que la proteólisis activada por calcio juega un papel crucial en el daño neuronal por hipoxia/isquemia, lo que puede resultar en la activación de caspasas, calpaína o catepsina por OGD/R (Lynch and Guttman, 2002; Yamashita, 2004; Doshi and Lynch, 2009). En el caso de DAPK1, la proteólisis por catepsina B (Shamloo et al., 2005) se ha descrito entre los aa 836-947 de DAPK1. No queda claro el papel que podrían tener las moléculas de DAPK1 truncadas ni si la proteólisis sería necesaria para la completa activación de DAPK1 (Shamloo et al., 2005). Sin embargo, sí sabemos que una de las mitades de DAPK1 resultantes del corte por catepsina mantendría los dominios quinasa, unión a CaM, unión a citoesqueleto y las repeticiones anquirina (Figura 14). Esta es la mitad de DAPK1 reconocida por el anticuerpo utilizado en la Co-IP. La delección del dominio de muerte tras la acción de catepsina B reduce la capacidad de DAPK1 para inducir muerte celular (Cohen et al., 1999; Cohen and Kimchi, 2001; Van Eldik, 2002) pero mantiene las repeticiones de anquirina que son importantes para la interacción con otras proteínas, el dominio de unión a citoesqueleto y el dominio catalítico que constituye el dominio más importante de DAPK1 y dirige también funciones proapoptóticas (Cohen and Kimchi, 2001).

En el presente trabajo hemos determinado que el incremento del porcentaje de DAPK1 proteolizada en el homogenizado neuronal tras la OGD/R o su desforilación no reduce su capacidad de unión al anticuerpo anti-DAPK1 durante la Co-IP. Tampoco altera su interacción con la subunidad NR2B en su forma completa o proteolizada, tal y como indica el incremento de los niveles de NR2B en el Co-IP-DAPK1 tras la OGD/R. Sin embargo, el efecto drástico de la OGD/R proteolizando y fosforilando DAPK1 sí podría alterar la capacidad de unión de DAPK1 a otras proteínas.

La complejidad de proteínas que inmunoprecipitan con DAPK1 en nuestro estudio proteómico, más de 300 si consideramos las muestras totales o más de 70 si consideramos las muestras de membrana plasmática, era esperable debido a que se han identificado casi 200 proteínas consideradas posibles sustratos/moléculas reguladoras de DAPK1 (Bialik and Kimchi, 2014).

Es importante destacar que no esperamos un único complejo que contenga el total de las moléculas que pueden interaccionar con DAPK1, sino más bien que en cada localización subcelular (p.e. membrana, mitocondria u otros orgánulos, o citoplasma) el interactoma de DAPK1 pueda ser ligeramente distinto. El objetivo de esta segunda parte de la tesis es identificar dianas de intervención por debajo de los NMDARs extrasinápticos que pudieran mediar la muerte excitotóxica durante la isquemia. Estas dianas podrían estar interaccionando con DAPK1 asociadas a NMDARs presentes en la membrana plasmática o localizados en el citosol por debajo del receptor pero sin estar en contacto con la membrana. Por ello, para la identificación de los posibles candidatos analizamos en paralelo el interactoma de DAPK1 en la muestra total (membrana plasmática, citoplasma) y el interactoma en muestra obtenida de membrana plasmática.

El análisis exhaustivo de las proteínas diferenciales del estudio proteómico en Co-IP-DAPK1 de muestra total en condiciones control y OGD/R, indicó que el 30% de las proteínas diferenciales identificadas se habían descrito previamente en interacción directa con DAPK1 o con NR2B. Además, hasta el 60% habían sido

descritas unidas a proteínas como actina, α -actinina, AP-2 o espectrina, proteínas que se encuentran en interacción directa con NR2B.

La diferencia respecto al número de proteínas identificadas en muestra total (303) o muestra de membrana (71) podría explicarse por la eliminación del contenido citosólico en las muestras de membrana pero también por la dificultad de detección de LC-MS/MS de proteínas poco abundantes en una muestra con contenido proteico bajo (muestra de membrana). Del total de proteínas identificadas, el 16% de las proteínas de muestra total varía (incrementa o disminuye) por efecto de la OGD/R frente al 32% de las proteínas en muestra de membrana. Respecto a la clase de proteínas que encontramos en cada condición, la contribución de proteínas de citoesqueleto coincide en ambos tipos de muestra; 45% en muestra total y 43% en muestra de membrana. En la muestra de membrana se identificaron más proteínas implicadas en tráfico de membrana o con función transportadora o receptores que en la muestra total. Estos resultados confirman que efectivamente hemos conseguido un enriquecimiento en membrana celular respecto a la muestra total.

Se identificaron 2 proteínas diferenciales en el Co-IP-DAPK1 que coincidían en el estudio de muestra total y en el de membrana (Tabla 12). Estas proteínas, *Microtubule-associated protein 6 (MAP-6)* y *CLIP-associating protein 2 (CLASP2)*, se hallarían en el CoIP-DAPK1 unidas directa o indirectamente, a proteínas localizadas en la membrana plasmática. Ambas son proteínas relacionadas con citoesqueleto o juegan un papel en la remodelación del citoesqueleto, efecto que es conocido y que se produce como consecuencia de la activación excitotóxica de los receptores de NMDA (Hernandez et al., 2013).

En la aproximación proteómica por LC-MS/MS en las muestras de membrana no se observó el reclutamiento de NR2B al interactoma de DAPK1. Esto era totalmente inesperado y de hecho, mediante WB sí pudimos observar que la OGD/R incrementaba la cantidad de NR2B en el Co-IP-DAPK1 pero la inmunoreactividad observada fue más débil que en muestra total. Estos

resultados sugieren que la reducida cantidad de proteína obtenida a partir del extracto de membrana podía ser insuficiente para el estudio con LC-MS/MS.

Por ello, con el objetivo de evaluar posibles candidatos entre aquellos con presencia alterada por la OGD/R nos centramos únicamente en la Co-IP-DAPK1 de muestra total. Se escogieron aquellas proteínas identificadas en el estudio proteómico con una variación mayor a 4.5 entre las condiciones control y OGD/R. De este modo, incrementábamos las posibilidades de identificar un candidato con una función importante dentro de la vía de señalización de muerte neuronal inducida por la subunidad NR2B. Descartamos proteínas relacionadas con el citoesqueleto o involucradas en la maquinaria de transcripción/traducción como las proteínas ribosomales o coactivadoras de la transcripción así como proteínas con actividad chaperona porque al estar implicadas en un gran número de procesos celulares no constituyen buenos candidatos sobre los que intervenir para actuar específicamente sobre la señalización de los NMDARs-NR2B.

Tabla 14. Proteínas identificadas en el Co-IP-DAPK1 de muestra total que varían más de 4.5 veces tras la OGD/R.

Proteína	Uniprot	Función molecular - Isquemia	FoldChange	Interacción publicada con:
Proteínas de membrana				
<i>Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B</i> (NR2B)	Q00960	Subunidad principalmente extrasináptica que señala a muerte en condiciones patológicas (Tu et al., 2010)	Aparece	DAPK-1 (Tu et al., 2010)
Quinasas/fosfatasas				
<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha</i> (CaMK-II subunit alpha)	P11798	El estímulo excitotóxico incrementa la unión CamKII-NR2B (Fan et al., 2014)	5,141	NR2B (Mao et al., 2014; Sanz-Clemente et al., 2013; Gardoni et al., 2006), CRMP2 (Hou et al., 2009)
<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta</i> (CaMK-II subunit delta)	Q8CCM0		↑ 5,609	
<i>Protein Kinase C beta type</i> (PKC-B)	P68403	Fosforila a NR2B en Ser-1303 potenciando la función del canal NMDAR (Liao et al., 2001; Ramya et al., 2012)	Aparece	NR2B (Liao et al., 2001; Ramya et al., 2012), AP-2 (Chen et al., 2006), CX43 (Smyth, 2014)

<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4</i> (MAP3K4)	P97820	Media la activación de p38 MPK (Warr et al., 2012; Sapkota, 2013)	Desaparece	-
<i>Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A</i>	Q10728	Regulador de PP1	Desaparece	-
<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform</i> (PP2A-beta)	P36876	Defosforila a NR2B y limita la sobreactivación de los NMDARs (Farinelli et al., 2012; Ramya et al., 2012) y activa DAPK1 al defosforilarla (Gozuacik et al., 2008; Widau et al., 2010)	Desaparece	NR2B (Farinelli et al., 2012; Ramya et al., 2012), DAPK-1 (Gozuacik et al., 2008)
Proteasas				
<i>Cathepsin B</i> (RSG-2)	P00787	Incrementa en respuesta a la isquemia y amplifica el proceso apoptótico (Anagli et al., 2008)	Aparece	DAPK-1 (Lin et al., 2007)
Otras proteínas				
<i>Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1</i> (Lrrfip1)	Q66HF9	MCAO incrementa la expresión de Lrrfip1 en el área periinfarto (Mallolas et al., 2006)	↑5,523	-
<i>Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2</i> (Lrrfip2)	Q4V7E8	Importante en la vía de señalización Wnt (Liu et al., 2005)	↑4,455	-
<i>E3ubiquitin-protein ligase HERC2</i>	Q4U2R1	Integra complejos de proteínas y actúa como puente entre diferentes vías celulares (Galligan et al., 2015)	Aparece	-
<i>Matrin-3</i>	P43244	Su fosforilación por PKA en condiciones patológicas contribuye a la muerte neuronal (Giordano et al., 2005)	Aparece	-
<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2</i> (CRMP-2/DRP-2)	P47942	Promueve el crecimiento axonal (Fukata et al., 2002) y la internalización de la subunidad NR2B (Bretin et al., 2006; Brittain et al., 2011).	↓4,555	NR2B (Bretin et al., 2006; Brittain et al., 2011), Tubulin (Fukata et al., 2002), CamKII (Hou et al., 2009), PP1y (Cid et al., 2007)
<i>Protein DDI1 homolog 2</i>	A2ADY9	-	↓6,902	Syntaxin 1B (uniprot)

En muestra total, coincidiendo con lo descrito previamente para la subunidad NR2B (Tu 2009), se determinó un incremento en la Co-IP de NR2B con la proteína DAPK1 tras la OGD/R. Se determinó también, un incremento muy significativo de proteínas que previamente se han descrito unidas a NR2B como son, PKC y CaMKII (Colbran, 2004; Gardoni et al., 2006; Chen and Roche, 2007). Esto nos indica que la Co-IP-DAPK1 es capaz de identificar proteínas que se hallan interaccionando directamente con NR2B en el complejo NR2B-DAPK1. Las tres quinasas DAPK1, CaMKII y PKC, fosforilan el mismo residuo del extremo C-terminal de NR2B (Ser-1303); actualmente no se conoce el efecto de la fosforilación de CaMKII en Ser-1303 (Mao et al., 2014), sin embargo, la fosforilación de Ser-1303 mediante DAPK1 o PKC incrementa la conductividad del canal NMDAR (Liao et al., 2001). Es importante destacar que aunque CaMKII tiene un sitio de unión accesible también aunque la cola C-terminal haya sufrido proteólisis (Figura 11), PKC se une a los aa 1303 y 1323 y además se requiere la unión de DAPK1 a su único sitio de interacción con NR2B a nivel del residuo Ser-1303 para inmunoprecipitar el complejo. De modo que la coimmunoprecipitación de PKC con DAPK1 en condiciones en que gran parte de NR2B está proteolizado soporta la hipótesis de que la proteólisis de NR2B se produciría por debajo del aa 1303 o la hipótesis de la coexistencia de NR2B proteolizados con no proteolizados.

Entre las proteínas seleccionadas (Tabla 14), destaca el efecto contrario de la OGD/R sobre quinasas y fosfatasa. Las subunidades de CaMKII y PKC se encuentran más asociadas al Co-IP-DAPK1 tras la OGD/R mientras que PP1 y su dominio regulatorio, así como el dominio catalítico de PP2A reducen su asociación al interactoma de DAPK1. Se ha descrito que, en condiciones de isquemia, CaMKII se transloca a las zonas extrasinápticas y se une a NR2B (Ser-1303) (Strack and Colbran, 1998; Fan et al., 2014; Otmakhov et al., 2004), hecho que concuerda perfectamente con los resultados obtenidos por LC-MS/MS. Por otro lado, las fosfatasa son responsables de controlar diversos procesos celulares mediante la regulación de vías de señalización iniciadas por quinasas (Lechward K 2001;

Bononi A 2011). PP1 y PP2A suprimen la actividad de NMDARs en neuronas hipocampales y su inhibición incrementa el flujo a través de los NMDARs (Wang et al., 1994), induciendo daño cerebral (Hedou et al., 2008; Koh, 2011). Así la OGD/R provoca un desajuste en el balance de actividad quinasa/fosfatasa, incrementando en el interactoma de DAPK1 la actividad de las quinasas y reduciendo el efecto de las fosfatasa.

Entre las proteínas que aparecieron en el Co-IP-DAPK1 tras la OGD/R, se identificaron la proteína Catepsina B, la E3 ubiquitin ligasa HERC2 y la proteína Matrina-3. Respecto a Catepsina B, se ha descrito una región de unión de Catepsina B a DAPK1 en la región correspondiente a los aa 836–947 (Lin et al., 2007). La unión de Catepsina a esta región se estimula durante la apoptosis inducida por TNFR-1 y se produce una relocalización de Catepsina B y DAPK1 en el citosol (Lin et al., 2007), dato que coincide con la identificación de esta proteína en la Co-IP-DAPK1 de muestras totales a OGD/R pero no así en el Co-IP-DAPK1 de muestra de membrana. Además, Catepsina B se ha descrito como la responsable de la proteólisis de DAPK1 en condiciones de OGD (Shamloo et al., 2005). En el caso de HERC2 no hemos encontrado trabajos relacionados con daño neurotóxico en isquemia o relacionado con NMDARs ni DAPK1. Un estudio reciente ha identificado 300 potenciales interactores de HERC2 e implica a HERC2 en varios procesos celulares importantes como transporte, síntesis de proteína y metabolismo energético (Galligan et al., 2015). Por otro lado, la proteína Matrina-3, una proteína de unión a Ca^{2+}/CaM , ha sido descrita previamente relacionada con NMDARs (Giordano et al., 2005; Valencia et al., 2007). Se demostró que en condiciones fisiológicas Matrina-3 tiene la función de transmitir la información de los NMDARs sinápticos al núcleo neuronal, pero la excesiva activación de NMDARs conduce a la fosforilación de Matrina-3 por PKA provocando su degradación e induciendo muerte neuronal en cultivos de neuronas de cerebelo (Giordano et al., 2005). Teniendo en cuenta los datos presentados, de estas tres proteínas solamente Matrina-3 se perfila como posible candidata a ser estudiada en relación a la señalización a muerte a través de NMDAR-NR2B. En cambio, la

función de Catepsina B sobre DAPK1 ya ha sido descrita y HERC2 participa en múltiples procesos, por lo que no son considerados candidatos potenciales.

Las proteínas Lrrfip1 y Lrrfip2 mostraron un destacado incremento en su asociación al Co-IP-DAPK1 tras la OGD/R. Ambas proteínas pertenecen a la familia de proteínas que interaccionan con el dominio rico en leucina (LRR) de la proteína FLI. Trabajos recientes han implicado a esta familia de proteínas en desordenes del sistema nervioso (de Wit et al., 2011; de Wit and Ghosh, 2014). Se ha descrito que la proteína Lrrfip2 activa la actividad transcripcional dependiente de beta-catenina (Liu et al., 2005). Por otro lado, la proteína Lrrfip1 se ha identificado como promotora de invasión celular y metástasis (Ohtsuka et al., 2011; Ariake et al., 2012) y moduladora de múltiple vías de señalización involucradas en el daño isquémico y recuperación, como son la señalización TLR en neuroinflamación y daño cerebral isquémico (Caso et al., 2007) así como la señalización por beta-catenina en neurogénesis inducida por ictus (Lei et al., 2008). En 2006 se describió por primera vez que la MCAO en ratas induce de forma remarcable la expresión de Lrrfip1, que en condiciones control es muy baja (Mallolas et al., 2006). En 2014, se estudiaron diferentes isoformas de Lrrfip1 y se confirmó también una sobreexpresión de la principal isoforma de Lrrfip1 tras la isquemia cerebral en astrocitos y en neuronas (Gubern et al., 2014). Este último estudio mostró que el papel de esta proteína en astrocitos sería protector activando vías de supervivencia. Creemos que es necesario estudiar la función de Lrrfip1 y Lrrfip2 en neuronas para determinar el papel que juegan en el interactoma de DAPK1 total y determinar si son buenos candidatos para intervenir en la vía de muerte inducida por los NMDARs extrasinápticos.

Una de las proteínas que disminuía en el interactoma de DAPK1 es la proteína collapsin response mediator protein CRMP2/DRP2, mediador intracelular que promueve el crecimiento axonal regulando el ensamblaje de microtúbulos (Inagaki et al., 2001, Fukata et al., 2002). Previamente, se había descrito que la isquemia cerebral provocaba la proteólisis de CRMP2 por calpaína y que este

CRMP2 proteolizado se unía al dominio C-terminal de NR2B provocando su internalización y reduciendo la neurotoxicidad (Bretin et al., 2006; Brittain et al., 2011). Mediante la Co-IP-DAPK1 tras la OGD/R hemos identificado otras proteínas que también están involucradas en endocitosis como los componentes del citoesqueleto espectrina, dineína, cortactina o filamentos de actina y componentes del complejo AP-2. Este último, AP-2, que disminuía en el Co-IP-DAPK1 de membrana, había sido descrito previamente interactuando con la subunidad NR2B (Nong 2003). En conjunto, estos resultados sugieren que la OGD/R reduce la presencia en el Co-IP-DAPK1 de moléculas involucradas en procesos de endocitosis. Otra de las proteínas que disminuía en el interactoma de DAPK1 tras la OGD/R es la proteína Ddl1 homolog 2, que interactúa con Syntaxin-1B (STRING, 2015), proteína de la familia de la sintaxinas que tienen un lugar de unión a DAPK1.

Finalmente, y aunque no cumplía el criterio de exclusión de 4,5, observamos un incremento en la asociación de GIPC al Co-IP-DAPK1 de muestra total tras la OGD/R pero no en muestra de extracto de membrana plasmática. La proteína GIPC se une a NR2B y parece tener un papel importante en la estabilización de los receptores en la superficie de la membrana neuronal extrasináptica (Yi et al., 2007). GIPC es capaz de interactuar con α -actininas/actina/miosina VI y se distribuye extensamente en el citoplasma donde se asocia con NMDARs intracelulares internalizados en endosomas (Yano et al., 2006; Yi et al., 2007). Por ello, esperábamos que gran parte de los complejos conteniendo DAPK1/GIPC se hallaran en tránsito en el citoplasma celular. Por tanto, la eliminación del citoplasma en la muestra de membrana es coherente con el hecho de no observar presencia de GIPC en estas muestras. Por otro lado, la proteólisis de NR2B por calpaína tendría que haber eliminado el sitio de unión de GIPC en NMDARs de membrana, así que el incremento de asociación al Co-IP-DAPK1 podría deberse simplemente al incremento en la unión de DAPK1 con subunidades NR2B no proteolizadas unidas a GIPC.

En resumen, como resultado de la segunda parte de esta tesis doctoral, hemos seleccionado las proteínas matrin-3, Lrrfip1, Lrrfip2 y Ddl1 homolog 2 como los 4 candidatos más interesantes para ser considerados dianas de intervención terapéutica en la señalización de muerte neuronal inducida por los NR2B-NMDARs extrasinápticos. Resultados preliminares (no mostrados en esta tesis) indican por WB que la OGD/R incrementa la asociación de LRRFIP1 al complejo Co-IP-DAPK1. Son necesarios estudios específicos para cada una de estas proteínas para determinar su potencial real como candidatos para impedir la muerte neuronal inducida por NMDARs extrasinápticos.

En conjunto, el trabajo comprendido en esta tesis doctoral ha demostrado que la activación selectiva de NMDARs sinápticos tras la OGD/R incrementa los niveles de pCREB y protege a las neuronas en cultivo de la muerte excitotóxica. También hemos demostrado que el tratamiento con o-ATV incrementa los niveles de pCREB y protege específicamente a las neuronas GABAérgicas presentes en los cultivos corticales; indicando que o-ATV es un potencial candidato para proteger a las neuronas del daño excitotóxico producido por un episodio de isquemia. Por otro lado, mediante la coinmunoprecipitación de DAPK1 y su interactoma hemos identificado cuatro posibles candidatos (matrin-3, Lrrfip1, Lrrfip2 y Ddl1 homolog 2) que constituyen dianas potenciales para intervenir en la vía de señalización hacia muerte neuronal inducida por los NMDARs extrasinápticos.

CONCLUSIONES

Basándonos en los objetivos citados al principio de esta tesis, y una vez realizados los experimentos y analizado los resultados obtenidos, podemos concluir que:

CONCLUSIONES DE LA HIPÓTESIS 1:

1. La activación selectiva de receptores de NMDA sinápticos tras la OGD incrementa los niveles de pCREB y protege a las neuronas corticales en cultivo de la muerte excitotóxica.
2. La administración de ATV tras la OGD no afecta a los niveles de pCREB ni tampoco presenta efecto protector.
3. La administración del metabolito o-ATV tras la OGD incrementa los niveles de pCREB en las neuronas GABAérgicas presentes en los cultivos de neuronas corticales y las protege de la muerte inducida por OGD/R.
4. La característica abundancia de receptores de NMDA sinápticos de las neuronas GABAérgicas se asocia al incremento en los niveles de pCREB y a la neuroprotección otorgada por o-ATV a este subtipo neuronal.
5. El tratamiento con o-ATV es un potencial candidato como nuevas terapias dirigidas a proteger a las neuronas del daño excitotóxico producido por la isquemia cerebral.

CONCLUSIONES DE LA HIPÓTESIS 2:

1. La coinmunoprecipitación con anticuerpo anti-DAPK1 permite la inmunoprecipitación de la subunidad NR2B de los receptores de tipo NMDA. La proteólisis de DAPK1 y del extremo C-terminal de NR2B inducida por la OGD/R no impide la interacción entre ambas proteínas.

2. La proteína DAPK1 proteolizada de 100 KDa es la forma mayoritaria unida a NR2B en condiciones de OGD/R, tanto en muestra total como en muestra de membrana.
3. La coimmunoprecipitación con anticuerpo anti-DAPK1 tanto a partir de muestra total como de muestra de membrana, permite la obtención del interactoma de DAPK1 así como la obtención del interactoma de la subunidad NR2B.
4. La mayoría de las proteínas que cambian su asociación al complejo coimmunoprecipitado con DAPK1 tras la OGD son constituyentes del citoesqueleto o juegan un papel en su remodelación.
5. La OGD/R provoca un desajuste en el balance de actividad quinasa/fosfatasa, incrementando en el interactoma de DAPK1 la actividad de las quinasas y reduciendo las fosfatasa.
6. La OGD/R reduce la asociación al complejo DAPK1-NR2B de proteínas involucradas en procesos de endocitosis como CRMP2 o subunidades del complejo de internalización AP-2.
7. Se han identificado cuatro posibles candidatos, matrin-3, Lrrfip1, Lrrfip2 y Ddl1 homolog 2 como moléculas alteradas en el Co-IP-DAPK1 por efecto de la OGD/R que no habían sido descritas previamente interaccionando ni con DAPK1 ni con la subunidad NR2B de los NMDARs. Por ello, constituyen dianas potenciales para intervenir en la vía de señalización hacia muerte neuronal inducida por los NMDARs extrasinápticos. Se requieren estudios específicos para cada una de ellas para determinar su potencial real como dianas para intervenir sobre la muerte neuronal inducida por NMDARs extrasinápticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aarts M, Iihara K, Wei WL, Xiong ZG, Arundine M, Cerwinski W, MacDonald JF, Tymianski M (2003) A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell* 115:863-877.
- Aarts M, Liu Y, Liu L, Besshoh S, Arundine M, Gurd JW, Wang YT, Salter MW, Tymianski M (2002) Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. *Science* 298:846-850.
- Al-Hallaq RA, Conrads TP, Veenstra TD, Wenthold RJ (2007) NMDA di-heteromeric receptor populations and associated proteins in rat hippocampus. *J Neurosci* 27:8334-8343.
- Albers GW, Atkinson RP, Kelley RE, Rosenbaum DM. (1995) Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the N-methyl-D-aspartate antagonist dextrorphan in patients with acute stroke. Dextrorphan Study Group. *Stroke* 26:254-8
- Albers GW, Clark WM, Atkinson RP, Madden K, Data JL, Whitehouse MJ. (1999) Dose escalation study of the NMDA glycine-site antagonist licostinel in acute ischemic stroke. *Stroke* 30:508-13.
- Albers GW, Caplan LR, Easton JD, Fayad PB, Mohr JP, Saver JL, Sherman DG, Group TIAW (2002) Transient ischemic attack--proposal for a new definition. *The New England journal of medicine* 347:1713-1716.
- Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan R, Currie S, Stapley E, Albers-Schonberg G, Hensens O, Hirshfield J, Hoogsteen K, Liesch J, Springer J (1980) Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77:3957-3961.
- Alvarez Sabin J, Alonso de Lecinana M, Gallego J, Gil-Peralta A, Casado I, Castillo J, Diez Tejedor E, Gil A, Jimenez C, Lago A, Martinez-Vila E, Ortega A, Rebollo M, Rubio F, Grupo de Estudio de las Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Espanola de N (2006) [Plan for stroke healthcare delivery]. *Neurologia* 21:717-726.
- Allen CL, Bayraktutan U (2008) Risk factors for ischaemic stroke. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 3:105-116.
- Alli AA, Bao HF, Liu BC, Yu L, Aldrugh S, Montgomery DS, Ma HP, Eaton DC (2015) Calmodulin and CaMKII modulate ENaC activity by regulating the association of MARCKS and the cytoskeleton with the apical membrane. *American journal of physiology Renal physiology* 309:F456-463.
- Anagli J, Abounit K, Stemmer P, Han Y, Allred L, Weinsheimer S, Movsisyan A, Seyfried D (2008) Effects of cathepsins B and L inhibition on postischemic protein alterations in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 366:86-91.
- Andersson O, Stenqvist A, Attersand A, von Euler G (2001) Nucleotide sequence, genomic organization, and chromosomal localization of genes encoding the human NMDA receptor subunits NR3A and NR3B. *Genomics* 78:178-184.
- Anjum R, Roux PP, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J (2005) The tumor suppressor DAP kinase is a target of RSK-mediated survival signaling. *Curr Biol* 15:1762-1767.
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of

- necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15:961-973.
- Arai A, Vanderklish P, Kessler M, Lee K, Lynch G (1991) A brief period of hypoxia causes proteolysis of cytoskeletal proteins in hippocampal slices. *Brain research* 555:276-280.
- Arai K, Lok J, Guo S, Hayakawa K, Xing C, Lo EH (2011) Cellular mechanisms of neurovascular damage and repair after stroke. *Journal of child neurology* 26:1193-1198.
- Araki T, Shinoda S, Schindler CK, Quan-Lan J, Meller R, Taki W, Simon RP, Henshall DC (2004) Expression, interaction, and proteolysis of death-associated protein kinase and p53 within vulnerable and resistant hippocampal subfields following seizures. *Hippocampus* 14:326-336.
- Arboix A, Cendros V, Besa M, Garcia-Eroles L, Oliveres M, Targa C, Balcells M, Comes E, Massons J (2008) Trends in risk factors, stroke subtypes and outcome. Nineteen-year data from the Sagrat Cor Hospital of Barcelona stroke registry. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 26:509-516.
- Arboix A, Manzano C, Garcia-Eroles L, Massons J, Oliveres M, Parra O, Targa C (2006) Determinants of early outcome in spontaneous lobar cerebral hemorrhage. *Acta neurologica Scandinavica* 114:187-192.
- Ariake K, Ohtsuka H, Motoi F, Douchi D, Oikawa M, Rikiyama T, Fukase K, Katayose Y, Egawa S, Unno M (2012) GCF2/LRRFIP1 promotes colorectal cancer metastasis and liver invasion through integrin-dependent RhoA activation. *Cancer Lett* 325:99-107.
- Arundine M, Tymianski M (2004) Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci* 61:657-668.
- American Stroke Association (2015) Impact of Stroke (Stroke statistics) http://www.strokeassociation.org/STROKEORG/AboutStroke/Impact-of-Stroke_UCM_310728_Article.jsp.
- Baas PW (1997) Microtubules and axonal growth. *Current opinion in cell biology* 9:29-36.
- Babb TL, Mikuni N, Najm I, Wylie C, Olive M, Dollar C, MacLennan H (2005) Pre- and postnatal expressions of NMDA receptors 1 and 2B subunit proteins in the normal rat cortex. *Epilepsy research* 64:23-30.
- Bading H (2015) Bading Group.
- Bajbouj K, Poehlmann A, Kuester D, Drewes T, Haase K, Hartig R, Teller A, Kliche S, Walluscheck D, Ivanovska J, Chakilam S, Ullrich A, Bommhardt U, Leverkus M, Roessner A, Schneider-Stock R (2009) Identification of phosphorylated p38 as a novel DAPK-interacting partner during TNF α -induced apoptosis in colorectal tumor cells. *Am J Pathol* 175:557-570.
- Balduini W, Carloni S, Buonocore G (2012) Autophagy in hypoxia-ischemia induced brain injury. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 25 Suppl 1:30-34.
- Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, Cimino M (2001) Simvastatin protects against long-lasting behavioral and morphological consequences of neonatal

- hypoxic/ischemic brain injury. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 32:2185-2191.
- Baron JC (2001) Mapping the ischaemic penumbra with PET: a new approach. *Brain : a journal of neurology* 124:2-4.
- Baron JC (2005) How healthy is the acutely reperfused ischemic penumbra? *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 20 Suppl 2:25-31.
- Barrett-Connor E, Khaw KT (1988) Diabetes mellitus: an independent risk factor for stroke? *American journal of epidemiology* 128:116-123.
- Barth AL, Malenka RC (2001) NMDAR EPSC kinetics do not regulate the critical period for LTP at thalamocortical synapses. *Nature neuroscience* 4:235-236.
- Bell KF, Bent RJ, Meese-Tamuri S, Ali A, Forder JP, Aarts MM (2013) Calmodulin kinase IV-dependent CREB activation is required for neuroprotection via NMDA receptor-PSD95 disruption. *Journal of neurochemistry* 126:274-287.
- Bell RM, Yellon DM (2003) Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway. *J Am Coll Cardiol* 41:508-515.
- Benarroch EE (2011) NMDA receptors: recent insights and clinical correlations. *Neurology* 76:1750-1757.
- Bender KJ, Allen CB, Bender VA, Feldman DE. (2006) Synaptic basis for whisker deprivation-induced synaptic depression in rat somatosensory cortex. *J Neurosci* 26:4155-65.
- Bezrukov L, Blank PS, Polozov IV, Zimmerberg J (2009) An adhesion-based method for plasma membrane isolation: evaluating cholesterol extraction from cells and their membranes. *Anal Biochem* 394:171-176.
- Bhave SV, Ghoda L, Hoffman PL (1999) Brain-derived neurotrophic factor mediates the anti-apoptotic effect of NMDA in cerebellar granule neurons: signal transduction cascades and site of ethanol action. *J Neurosci* 19:3277-3286.
- Bi X, Rong Y, Chen J, Dang S, Wang Z, Baudry M (1998) Calpain-mediated regulation of NMDA receptor structure and function. *Brain research* 790:245-253.
- Bialik S, Berissi H, Kimchi A (2008) A high throughput proteomics screen identifies novel substrates of death-associated protein kinase. *Mol Cell Proteomics* 7:1089-1098.
- Bialik S, Bresnick AR, Kimchi A (2004) DAP-kinase-mediated morphological changes are localization dependent and involve myosin-II phosphorylation. *Cell Death Differ* 11:631-644.
- Bialik S, Kimchi A (2004) DAP-kinase as a target for drug design in cancer and diseases associated with accelerated cell death. *Seminars in cancer biology* 14:283-294.
- Bialik S, Kimchi A (2006) The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. *Annual review of biochemistry* 75:189-210.
- Bialik S, Kimchi A (2014) The DAP-kinase interactome. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 19:316-328.
- Binshtok AM, Fleidervish IA, Sprengel R, Gutnick MJ (2006) NMDA receptors in layer 4 spiny stellate cells of the mouse barrel cortex contain the NR2C subunit. *J Neurosci* 26:708-715.
- Black AE, Hayes RN, Roth BD, Woo P, Woolf TF (1999) Metabolism and excretion of atorvastatin in rats and dogs. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 27:916-923.

- Blanchet PJ, Konitsiotis S, Whittemore ER, Zhou ZL, Woodward RM, Chase TN (1999) Differing effects of N-methyl-D-aspartate receptor subtype selective antagonists on dyskinesias in levodopa-treated 1-methyl-4-phenyl-tetrahydropyridine monkeys. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 290:1034-1040.
- Bolanos JP, Almeida A, Moncada S (2010) Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends in biochemical sciences* 35:145-149.
- Bononi A, Agnoletto C, De Marchi E, Marchi S, Patergnani S, Bonora M, Giorgi C, Missiroli S, Poletti F, Rimessi A, Pinton P. (2011) Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. *Enzyme Res.*
- Borek-Dohalsky V, Huclova J, Barrett B, Nemec B, Ulc I, Jelinek I (2006) Validated HPLC-MS-MS method for simultaneous determination of atorvastatin and 2-hydroxyatorvastatin in human plasma-pharmacokinetic study. *Analytical and bioanalytical chemistry* 386:275-285.
- Bosel J, Gandor F, Harms C, Synowitz M, Harms U, Djoufack PC, Megow D, Dirnagl U, Hortnagl H, Fink KB, Endres M (2005) Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *Journal of neurochemistry* 92:1386-1398.
- Brassai A, Suvanjeviev RG, Ban EG, Lakatos M (2015) Role of synaptic and nonsynaptic glutamate receptors in ischaemia induced neurotoxicity. *Brain research bulletin* 112:1-6.
- Bretin S, Rogemond V, Marin P, Maus M, Torrens Y, Honnorat J, Glowinski J, Premont J, Gauchy C (2006) Calpain product of WT-CRMP2 reduces the amount of surface NR2B NMDA receptor subunit. *Journal of neurochemistry* 98:1252-1265.
- Brigman JL, Wright T, Talani G, Prasad-Mulcare S, Jinde S, Seabold GK, Mathur P, Davis MI, Bock R, Gustin RM, Colbran RJ, Alvarez VA, Nakazawa K, Delpire E, Lovinger DM, Holmes A (2010) Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning. *J Neurosci* 30:4590-4600.
- Brittain JM, Duarte DB, Wilson SM, Zhu W, Ballard C, Johnson PL, Liu N, Xiong W, Ripsch MS, Wang Y, Fehrenbacher JC, Fitz SD, Khanna M, Park CK, Schmutzler BS, Cheon BM, Due MR, Brustovetsky T, Ashpole NM, Hudmon A, Meroueh SO, Hingtgen CM, Brustovetsky N, Ji RR, Hurley JH, Jin X, Shekhar A, Xu XM, Oxford GS, Vasko MR, White FA, Khanna R (2011) Suppression of inflammatory and neuropathic pain by uncoupling CRMP-2 from the presynaptic Ca(2)(+) channel complex. *Nat Med* 17:822-829.
- Brouns R, De Deyn PP (2009) The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clinical neurology and neurosurgery* 111:483-495.
- Buck BH, Liebeskind DS, Saver JL, Bang OY, Yun SW, Starkman S, Ali LK, Kim D, Villablanca JP, Salamon N, Razinia T, Ovbiagele B (2008) Early neutrophilia is associated with volume of ischemic tissue in acute stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39:355-360.
- Buttner F, Cordes C, Gerlach F, Heimann A, Alessandri B, Luxemburger U, Tureci O, Hankeln T, Kempfski O, Burmester T (2009) Genomic response of the rat brain to global ischemia and reperfusion. *Brain research* 1252:1-14.

- Calandre L, Arnal C, Ortega JF, Bermejo F, Felgeroso B, del Ser T, Vallejo A (1986) Risk factors for spontaneous cerebral hematomas. Case-control study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 17:1126-1128.
- Campbell BC, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, Yan B, Dowling RJ, Parsons MW, Oxley TJ, Wu TY, Brooks M, Simpson MA, Miteff F, Levi CR, Krause M, Harrington TJ, Faulder KC, Steinfort BS, Priglinger M, Ang T, Scroop R, Barber PA, McGuinness B, Wijeratne T, Phan TG, Chong W, Chandra RV, Bladin CF, Badve M, Rice H, de Villiers L, Ma H, Desmond PM, Donnan GA, Davis SM, Investigators E-I (2015) Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *The New England journal of medicine* 372:1009-1018.
- Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. *Trends in neurosciences* 28:436-445.
- Carlone S, Buonocore G, Balduini W (2008) Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiology of disease* 32:329-339.
- Carlone S, Girelli S, Scopa C, Buonocore G, Longini M, Balduini W (2010) Activation of autophagy and Akt/CREB signaling play an equivalent role in the neuroprotective effect of rapamycin in neonatal hypoxia-ischemia. *Autophagy* 6: 366-77
- Carlone S, Girelli S, Buonocore G, Longini M, Balduini W (2009) Simvastatin acutely reduces ischemic brain damage in the immature rat via Akt and CREB activation. *Exp Neurol* 220:82-89.
- Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I (2007) Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* 115:1599-1608.
- Castillo J, Alvarez-Sabin J, Davalos A, Diez-Tejedor E, Lizasoain I, Martinez-Vila E, Vivancos J, Zarranz JJ (2003) [Consensus review. Pharmacological neuroprotection in cerebral ischemia: is it still a therapeutic option?]. *Neurologia* 18:368-384.
- Cathala L, Misra C, Cull-Candy S (2000) Developmental profile of the changing properties of NMDA receptors at cerebellar mossy fiber-granule cell synapses. *J Neurosci* 20:5899-5905.
- Cespedes-Rubio A, Jurado FW, Cardona-Gomez GP (2010) p120 catenin/alphaN-catenin are molecular targets in the neuroprotection and neuronal plasticity mediated by atorvastatin after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 88:3621-3634.
- Cid C, Garcia-Bonilla L, Camafeita E, Burda J, Salinas M, Alcazar A (2007) Proteomic characterization of protein phosphatase 1 complexes in ischemia-reperfusion and ischemic tolerance. *Proteomics* 7:3207-3218.
- Cilla DD, Jr., Whitfield LR, Gibson DM, Sedman AJ, Posvar EL (1996) Multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy subjects. *Clinical pharmacology and therapeutics* 60:687-695.
- Cimino M, Gelosa P, Gianella A, Nobili E, Tremoli E, Sironi L (2007) Statins: multiple mechanisms of action in the ischemic brain. *Neuroscientist* 13:208-213.
- Citri A, Harari D, Shohat G, Ramakrishnan P, Gan J, Lavi S, Eisenstein M, Kimchi A, Wallach D, Pietrokovski S, Yarden Y (2006) Hsp90 recognizes a common

- surface on client kinases. *The Journal of biological chemistry* 281:14361-14369.
- Cohen O, Feinstein E, Kimchi A (1997) DAP-kinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J* 16:998-1008.
- Cohen O, Inbal B, Kissil JL, Raveh T, Berissi H, Spivak-Kroizaman T, Feinstein E, Kimchi A (1999) DAP-kinase participates in TNF- α - and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain. *J Cell Biol* 146:141-148.
- Cohen O, Kimchi A (2001) DAP-kinase: from functional gene cloning to establishment of its role in apoptosis and cancer. *Cell Death Differ* 8:6-15.
- Colbran RJ (2004) Targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* 378:1-16.
- Coles CH, Bradke F (2015) Coordinating neuronal actin-microtubule dynamics. *Curr Biol* 25:R677-691.
- Comporti M (1989) Three models of free radical-induced cell injury. *Chemico-biological interactions* 72:1-56.
- Cook DJ, Teves L, Tymianski M (2012) A translational paradigm for the preclinical evaluation of the stroke neuroprotectant Tat-NR2B9c in gyrencephalic nonhuman primates. *Science translational medicine* 4:154ra133.
- Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM (2006) DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 126:121-134.
- Chakilam S, Gandesiri M, Rau TT, Agaimy A, Vijayalakshmi M, Ivanovska J, Wirtz RM, Schulze-Luehrmann J, Benderska N, Wittkopf N, Chellappan A, Ruemmele P, Vieth M, Rave-Frank M, Christiansen H, Hartmann A, Neufert C, Atreya R, Becker C, Steinberg P, Schneider-Stock R (2013) Death-associated protein kinase controls STAT3 activity in intestinal epithelial cells. *Am J Pathol* 182:1005-1020.
- Chan PH (2001) Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:2-14.
- Chandler LJ, Sutton G, Dorairaj NR, Norwood D (2001) N-methyl D-aspartate receptor-mediated bidirectional control of extracellular signal-regulated kinase activity in cortical neuronal cultures. *The Journal of biological chemistry* 276:2627-2636.
- Chandrasekar R (2013) Alcohol and NMDA receptor: current research and future direction. *Frontiers in molecular neuroscience* 6:14.
- Chapin SJ, Bulinski JC (1994) Cellular microtubules heterogeneous in their content of microtubule-associated protein 4 (MAP4). *Cell motility and the cytoskeleton* 27:133-149.
- Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415:793-798.
- Cheeseman KH, Slater TF (1993) An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin* 49:481-493.
- Chen BS, Roche KW (2007) Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology* 53:362-368.

- Chen CH, Tang SC, Tsai LK, Hsieh MJ, Yeh SJ, Huang KY, Jeng JS (2014a) Stroke code improves intravenous thrombolysis administration in acute ischemic stroke. *PLoS one* 9:e104862.
- Chen CH, Wang WJ, Kuo JC, Tsai HC, Lin JR, Chang ZF, Chen RH (2005) Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. *EMBO J* 24:294-304.
- Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang Y, Wang L, Jiang H, Zhang C, Lu M, Katakowski M, Feldkamp CS, Chopp M (2003) Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Annals of neurology* 53:743-751.
- Chen M, Lu TJ, Chen XJ, Zhou Y, Chen Q, Feng XY, Xu L, Duan WH, Xiong ZQ (2008) Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39:3042-3048.
- Chen Q, He S, Hu XL, Yu J, Zhou Y, Zheng J, Zhang S, Zhang C, Duan WH, Xiong ZQ (2007) Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in activity-dependent brain-derived neurotrophic factor gene regulation and limbic epileptogenesis. *J Neurosci* 27:542-552.
- Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD (1986) A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 17:738-743.
- Chen W, Sun Y, Liu K, Sun X (2014b) Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia. *Neural regeneration research* 9:1210-1216.
- Chen Z, Krmar RT, Dada L, Efendiev R, Leibiger IB, Pedemonte CH, Katz AI, Sznajder JI, Bertorello AM (2006) Phosphorylation of adaptor protein-2 mu2 is essential for Na⁺,K⁺-ATPase endocytosis in response to either G protein-coupled receptor or reactive oxygen species. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 35:127-132.
- Chen Z, Zhou Q, Zhang M, Wang H, Yun W, Zhou X (2014c) Co-activation of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors by neuronal insults determines cell death in acute brain slice. *Neurochemistry international* 78:28-34.
- Cheung NS, Pascoe CJ, Giardina SF, John CA, Beart PM (1998) Micromolar L-glutamate induces extensive apoptosis in an apoptotic-necrotic continuum of insult-dependent, excitotoxic injury in cultured cortical neurones. *Neuropharmacology* 37:1419-1429.
- Chi SW (2014) Structural insights into the transcription-independent apoptotic pathway of p53. *BMB reports* 47:167-172.
- Choi DW (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends in neurosciences* 11:465-469.
- Choi DW, Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annual review of neuroscience* 13:171-182.
- Choi IY, Ju C, Anthony Jalin AM, Lee da I, Prather PL, Kim WK (2013) Activation of cannabinoid CB2 receptor-mediated AMPK/CREB pathway reduces cerebral ischemic injury. *Am J Pathol* 182:928-939.
- Choo AM, Geddes-Klein DM, Hockenberry A, Scarsella D, Mesfin MN, Singh P, Patel TP, Meaney DF (2012) NR2A and NR2B subunits differentially mediate MAP kinase signaling and mitochondrial morphology following excitotoxic insult. *Neurochemistry international* 60:506-516.

- Chuang YT, Lin YC, Lin KH, Chou TF, Kuo WC, Yang KT, Wu PR, Chen RH, Kimchi A, Lai MZ (2011) Tumor suppressor death-associated protein kinase is required for full IL-1 β production. *Blood* 117:960-970.
- Chung HJ, Huang YH, Lau LF, Haganir RL (2004) Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J Neurosci* 24:10248-10259.
- Dalva MB, Takasu MA, Lin MZ, Shamah SM, Hu L, Gale NW, Greenberg ME (2000) EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103:945-956.
- Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W, Chen HS, Lipton SA, Nakanishi N (1998) Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 393:377-381.
- Davis M, Perry RH, Mendelow AD (1997) The effect of non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonism on cerebral oedema and cerebral infarct size in the aging ischaemic brain. *Acta neurochirurgica Supplement* 70:30-33.
- de Bartolomeis A, Latte G, Tomasetti C, Iasevoli F (2014) Glutamatergic postsynaptic density protein dysfunctions in synaptic plasticity and dendritic spines morphology: relevance to schizophrenia and other behavioral disorders pathophysiology, and implications for novel therapeutic approaches. *Mol Neurobiol.*;49:484-511
- de Diego I, Kuper J, Bakalova N, Kursula P, Wilmanns M (2010) Molecular basis of the death-associated protein kinase-calcium/calmodulin regulator complex. *Science signaling* 3:ra6.
- De Vries L, Lou X, Zhao G, Zheng B, Farquhar MG (1998) GIPC, a PDZ domain containing protein, interacts specifically with the C terminus of RGS-GAIP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:12340-12345.
- de Wit J, Ghosh A (2014) Control of neural circuit formation by leucine-rich repeat proteins. *Trends in neurosciences* 37:539-550.
- de Wit J, Hong W, Luo L, Ghosh A (2011) Role of leucine-rich repeat proteins in the development and function of neural circuits. *Annual review of cell and developmental biology* 27:697-729.
- Deng W, Garrett C, Dombert B, Soura V, Banks G, Fisher EM, van der Brug MP, Hafezparast M (2010) Neurodegenerative mutation in cytoplasmic dynein alters its organization and dynein-dynactin and dynein-kinesin interactions. *The Journal of biological chemistry* 285:39922-39934.
- DeRidder MN, Simon MJ, Siman R, Auberson YP, Raghupathi R, Meaney DF (2006) Traumatic mechanical injury to the hippocampus in vitro causes regional caspase-3 and calpain activation that is influenced by NMDA receptor subunit composition. *Neurobiology of disease* 22:165-176.
- Diaz-Guzman J, Egado JA, Gabriel-Sanchez R, Barbera-Comes G, Fuentes-Gimeno B, Fernandez-Perez C, Group ISlotSPotSCDS (2012) Stroke and transient ischemic attack incidence rate in Spain: the IBERICTUS study. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 34:272-281.
- Diez-Tejedor E, Fuentes B (2001) Acute care in stroke: do stroke units make the difference? *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 11 Suppl 1:31-39.

- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews* 51:7-61.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences* 22:391-397.
- Dong YN, Waxman EA, Lynch DR (2004) Interactions of postsynaptic density-95 and the NMDA receptor 2 subunit control calpain-mediated cleavage of the NMDA receptor. *J Neurosci* 24:11035-11045.
- Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM (2008) Stroke. *Lancet* 371:1612-1623.
- Doshi S, Lynch DR (2009) Calpain and the glutamatergic synapse. *Frontiers in bioscience* 1:466-476.
- Ducruet AF, Grobely N, Zacharia BE, Hickman ZL, Yeh ML, Connolly ES (2009) Pharmacotherapy of cerebral ischemia. *Expert opinion on pharmacotherapy* 10:1895-1906.
- Duchen MR (2000) Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *The Journal of physiology* 529 Pt 1:57-68.
- Dunah AW, Wyszynski M, Martin DM, Sheng M, Standaert DG (2000) alpha-actinin-2 in rat striatum: localization and interaction with NMDA glutamate receptor subunits. *Brain Res Mol Brain Res* 79:77-87.
- Easton JD, Albers GW, Caplan LR, Saver JL, Sherman DG, Group TIAW (2004) Discussion: Reconsideration of TIA terminology and definitions. *Neurology* 62:S29-34.
- Edinger AL, Thompson CB (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current opinion in cell biology* 16:663-669.
- Eisenberg-Lerner A, Kimchi A (2007) DAP kinase regulates JNK signaling by binding and activating protein kinase D under oxidative stress. *Cell Death Differ* 14:1908-1915.
- Ejaz S, Williamson DJ, Ahmed T, Sitnikov S, Hong YT, Sawiak SJ, Fryer TD, Aigbirhio FI, Baron JC (2013) Characterizing infarction and selective neuronal loss following temporary focal cerebral ischemia in the rat: a multi-modality imaging study. *Neurobiology of disease* 51:120-132.
- Endo A, Kuroda M, Tanzawa K (1976) Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett* 72:323-326.
- Endres M (2005) Statins and stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:1093-1110.
- Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK (1998) Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:8880-8885.
- Erol A (2012) Death-associated proliferation kinetic in normal and transformed cells. *Cell cycle* 11:1512-1516.
- Esterbauer H, Koller E, Heckenast P, Moser R, Celotto C (1987) Cytotoxic lipid peroxidation products. *Progress in clinical and biological research* 236A:245-252.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine* 11:81-128.

- Fan X, Jin WY, Wang YT (2014) The NMDA receptor complex: a multifunctional machine at the glutamatergic synapse. *Frontiers in cellular neuroscience* 8:160.
- Farinelli M, Heitz FD, Grewe BF, Tyagarajan SK, Helmchen F, Mansuy IM (2012) Selective regulation of NR2B by protein phosphatase-1 for the control of the NMDA receptor in neuroprotection. *PLoS one* 7:e34047.
- Featherstone DE, Shippy SA (2008) Regulation of synaptic transmission by ambient extracellular glutamate. *Neuroscientist* 14:171-181.
- Feigin VL, Norrving B (2014) A new paradigm for primary prevention strategy in people with elevated risk of stroke. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 9:624-626.
- Ferraguti F, Shigemoto R (2006) Metabotropic glutamate receptors. *Cell and tissue research* 326:483-504.
- Fischer G, Mutel V, Trube G, Malherbe P, Kew JN, Mohacsi E, Heitz MP, Kemp JA (1997) Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 283:1285-1292.
- Flores-Soto ME, Chaparro-Huerta V, Escoto-Delgadillo M, Vazquez-Valls E, Gonzalez-Castaneda RE, Beas-Zarate C (2012) [Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits]. *Neurologia* 27:301-310.
- Folsom AR, Rasmussen ML, Chambless LE, Howard G, Cooper LS, Schmidt MI, Heiss G (1999) Prospective associations of fasting insulin, body fat distribution, and diabetes with risk of ischemic stroke. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Diabetes care* 22:1077-1083.
- Font MA, Arboix A, Krupinski J (2010) Angiogenesis, neurogenesis and neuroplasticity in ischemic stroke. *Current cardiology reviews* 6:238-244.
- Fordyce CB, Jagasia R, Zhu X, Schlichter LC (2005) Microglia Kv1.3 channels contribute to their ability to kill neurons. *J Neurosci* 25:7139-7149.
- Forrest D, Yuzaki M, Soares HD, Ng L, Luk DC, Sheng M, Stewart CL, Morgan JI, Connor JA, Curran T (1994) Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* 13:325-338.
- Foster KA, McLaughlin N, Edbauer D, Phillips M, Bolton A, Constantine-Paton M, Sheng M (2010) Distinct roles of NR2A and NR2B cytoplasmic tails in long-term potentiation. *J Neurosci* 30:2676-2685.
- Fuentes B, Diez-Tejedor E (2009) Stroke units: many questions, some answers. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 4:28-37.
- Fukata Y, Itoh TJ, Kimura T, Menager C, Nishimura T, Shiromizu T, Watanabe H, Inagaki N, Iwamatsu A, Hotani H, Kaibuchi K (2002) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nature cell biology* 4:583-591.
- Galjart N (2005) CLIPs and CLASPs and cellular dynamics. *Nature reviews Molecular cell biology* 6:487-498.
- Galligan JT, Martinez-Noel G, Arndt V, Hayes S, Chittenden TW, Harper JW, Howley PM (2015) Proteomic analysis and identification of cellular interactors of the giant ubiquitin ligase HERC2. *Journal of proteome research* 14:953-966.

- García-Bonilla L, Campos M, Giralt D, Salat D, Chacón P, Hernández-Guillamon M, Rosell A, Montaner J. (2012) Evidence for the efficacy of statins in animal stroke models: a meta-analysis. *J Neurochem*;122:233-43.
- Gardoni F, Polli F, Cattabeni F, Di Luca M (2006) Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation modulates PSD-95 binding to NMDA receptors. *The European journal of neuroscience* 24:2694-2704.
- Gascon S, Sobrado M, Roda JM, Rodriguez-Pena A, Diaz-Guerra M (2008) 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. *Molecular psychiatry* 13:99-114.
- Gil de Castro R, Gil-Nunez AC (2000) [Risk factors for ischemic stroke. I. Conventional risk factors]. *Revista de neurologia* 31:314-323.
- Ginsberg MD (1997) The new language of cerebral ischemia. *AJNR American journal of neuroradiology* 18:1435-1445.
- Ginsberg MD (2009) Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synaptic overview. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 40:S111-114.
- Giordano G, Sanchez-Perez AM, Montoliu C, Berezney R, Malyavantham K, Costa LG, Calvete JJ, Felipe V (2005) Activation of NMDA receptors induces protein kinase A-mediated phosphorylation and degradation of matrin 3. Blocking these effects prevents NMDA-induced neuronal death. *Journal of neurochemistry* 94:808-818.
- Gladding CM, Raymond LA (2011) Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. *Mol Cell Neurosci.*;48:308-20
- Gogas KR (2006) Glutamate-based therapeutic approaches: NR2B receptor antagonists. *Current opinion in pharmacology* 6:68-74.
- Goldberg MP, Choi DW (1993) Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* 13:3510-3524.
- Gory-Faure S, Windscheid V, Brocard J, Montessuit S, Tsutsumi R, Denarier E, Fukata Y, Bosc C, Delaroché J, Collomb N, Fukata M, Martinou JC, Pernet-Gallay K, Andrieux A (2014) Non-microtubular localizations of microtubule-associated protein 6 (MAP6). *PLoS one* 9:e114905.
- Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, Eesa M, Rempel JL, Thornton J, Roy D, Jovin TG, Willinsky RA, Sapkota BL, Dowlathshahi D, Frei DF, Kamal NR, Montanera WJ, Poppe AY, Ryckborst KJ, Silver FL, Shuaib A, Tampieri D, Williams D, Bang OY, Baxter BW, Burns PA, Choe H, Heo JH, Holmstedt CA, Jankowitz B, Kelly M, Linares G, Mandzia JL, Shankar J, Sohn SI, Swartz RH, Barber PA, Coutts SB, Smith EE, Morrish WF, Weill A, Subramaniam S, Mitha AP, Wong JH, Lowerison MW, Sajobi TT, Hill MD, Investigators ET (2015) Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *The New England journal of medicine* 372:1019-1030.
- Gozuacik D, Bialik S, Raveh T, Mitou G, Shohat G, Sabanay H, Mizushima N, Yoshimori T, Kimchi A (2008) DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell Death Differ* 15:1875-1886.
- Graham D, Darles G, Langer SZ (1992) The neuroprotective properties of ifenprodil, a novel NMDA receptor antagonist, in neuronal cell culture toxicity studies. *Eur J Pharmacol* 226:373-376.

- Grandati M, Verrecchia C, Revaud ML, Allix M, Boulu RG, Plotkine M (1997) Calcium-independent NO-synthase activity and nitrites/nitrates production in transient focal cerebral ischaemia in mice. *Br J Pharmacol* 122:625-630.
- Groc L, Choquet D, Stephenson FA, Verrier D, Manzoni OJ, Chavis P (2007) NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein Reelin. *J Neurosci* 27:10165-10175.
- Grotta J, Clark W, Coull B, Pettigrew LC, Mackay B, Goldstein LB, Meissner I, Murphy D, LaRue L. (1995) Safety and tolerability of the glutamate antagonist CGS 19755 (Selfotel) in patients with acute ischemic stroke. Results of a phase IIa randomized trial. *Stroke* 26:602-5
- Grupke S, Hall J, Dobbs M, Bix GJ, Fraser JF (2015) Understanding history, and not repeating it. Neuroprotection for acute ischemic stroke: from review to preview. *Clinical neurology and neurosurgery* 129:1-9.
- Gubern C, Camos S, Hurtado O, Rodriguez R, Romera VG, Sobrado M, Canadas R, Moro MA, Lizasoain I, Serena J, Mallolas J, Castellanos M (2014) Characterization of Gcf2/Lrrfip1 in experimental cerebral ischemia and its role as a modulator of Akt, mTOR and beta-catenin signaling pathways. *Neuroscience* 268:48-65.
- Gudermann T, Nurnberg B, Schultz G (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *Journal of molecular medicine* 73:51-63.
- Guillen D, Cofan F, Ros E, Millan O, Cofan M, Rimola A, Brunet M (2009) Determination of atorvastatin and its metabolite ortho-hydroxyatorvastatin in human plasma by on-line anion-exchange solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* 394:1687-1696.
- Gurd JW, Bissoon N (1997) The N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR2A and NR2B bind to the SH2 domains of phospholipase C-gamma. *Journal of neurochemistry* 69:623-630.
- Gutierrez-Vargas JA, Munoz-Manco JI, Garcia-Segura LM, Cardona-Gomez GP (2014) GluN2B N-methyl-D-aspartic acid receptor subunit mediates atorvastatin-Induced neuroprotection after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 92:1529-1548.
- Guttmann RP, Baker DL, Seifert KM, Cohen AS, Coulter DA, Lynch DR (2001) Specific proteolysis of the NR2 subunit at multiple sites by calpain. *Journal of neurochemistry* 78:1083-1093.
- Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, Mennerick S, Farber NB (2009) Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiology of disease* 34:1-10.
- Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H (1997) Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 385:260-5.
- Hardingham GE (2006a) 2B synaptic or extrasynaptic determines signalling from the NMDA receptor. *The Journal of physiology* 572:614-615.
- Hardingham GE (2006b) Pro-survival signalling from the NMDA receptor. *Biochemical Society transactions* 34:936-938.

- Hardingham GE, Arnold FJ, Bading H (2001) Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nature neuroscience* 4:261-267.
- Hardingham GE, Bading H (2002) Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated. *Biochimica et biophysica acta* 1600:148-153.
- Hardingham GE, Bading H (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 26:81-9
- Hardingham GE, Bading H (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature reviews* 11:682-696.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature neuroscience* 5:405-414.
- Harris AZ, Pettit DL (2008) Recruiting extrasynaptic NMDA receptors augments synaptic signaling. *Journal of neurophysiology* 99:524-533.
- Harrison B, Kraus M, Burch L, Stevens C, Craig A, Gordon-Weeks P, Hupp TR (2008) DAPK-1 binding to a linear peptide motif in MAP1B stimulates autophagy and membrane blebbing. *The Journal of biological chemistry* 283:9999-10014.
- Hatton CJ, Paoletti P (2005) Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. *Neuron* 46:261-274.
- Hawkins LM, Prybylowski K, Chang K, Moussan C, Stephenson FA, Wenthold RJ (2004) Export from the endoplasmic reticulum of assembled N-methyl-D-aspartic acid receptors is controlled by a motif in the c terminus of the NR2 subunit. *The Journal of biological chemistry* 279:28903-28910.
- Hayashi K, Kawai-Hirai R, Harada A, Takata K (2003a) Inhibitory neurons from fetal rat cerebral cortex exert delayed axon formation and active migration in vitro. *Journal of cell science* 116:4419-4428.
- Hayashi T, Noshita N, Sugawara T, Chan PH (2003b) Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:166-180.
- Hedou GF, Koshibu K, Farinelli M, Kilic E, Gee CE, Kilic U, Baumgartel K, Hermann DM, Mansuy IM (2008) Protein phosphatase 1-dependent bidirectional synaptic plasticity controls ischemic recovery in the adult brain. *J Neurosci* 28:154-162.
- Heiss WD, Kracht LW, Thiel A, Grond M, Pawlik G (2001) Penumbral probability thresholds of cortical flumazenil binding and blood flow predicting tissue outcome in patients with cerebral ischaemia. *Brain : a journal of neurology* 124:20-29.
- Henshall DC, Araki T, Schindler CK, Shinoda S, Lan JQ, Simon RP (2003) Expression of death-associated protein kinase and recruitment to the tumor necrosis factor signaling pathway following brief seizures. *Journal of neurochemistry* 86:1260-1270.
- Henshall DC, Schindler CK, So NK, Lan JQ, Meller R, Simon RP (2004) Death-associated protein kinase expression in human temporal lobe epilepsy. *Annals of neurology* 55:485-494.

- Henson MA, Roberts AC, Perez-Otano I, Philpot BD (2010) Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Progress in neurobiology* 91:23-37.
- Hernandez R, Blanco S, Peragon J, Pedrosa JA, Peinado MA (2013) Hypobaric hypoxia and reoxygenation induce proteomic profile changes in the rat brain cortex. *Neuromolecular medicine* 15:82-94.
- Hervas-Angulo A, Cabases-Hita JM, Forcen-Alonso T (2006) [Costs deriving from strokes from a social perspective. A retrospective incidence approach with a follow-up at three years]. *Revista de neurologia* 43:518-525.
- Higurashi M, Iketani M, Takei K, Yamashita N, Aoki R, Kawahara N, Goshima Y (2012) Localized role of CRMP1 and CRMP2 in neurite outgrowth and growth cone steering. *Dev Neurobiol* 72:1528-1540.
- Hill MD, Hachinski V (1998) Stroke treatment: time is brain. *Lancet* 352 Suppl 3:SIII10-14.
- Hill MD, Martin RH, Mikulis D, Wong JH, Silver FL, Terbrugge KG, Milot G, Clark WM, Macdonald RL, Kelly ME, Boulton M, Fleetwood I, McDougall C, Gunnarsson T, Chow M, Lum C, Dodd R, Poublanc J, Krings T, Demchuk AM, Goyal M, Anderson R, Bishop J, Garman D, Tymianski M, investigators Et (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 neurology* 11:942-950.
- Hirakawa T, Galet C, Kishi M, Ascoli M (2003) GIPC binds to the human lutropin receptor (hLHR) through an unusual PDZ domain binding motif, and it regulates the sorting of the internalized human choriogonadotropin and the density of cell surface hLHR. *The Journal of biological chemistry* 278:49348-49357.
- Holmes KD, Mattar PA, Marsh DR, Weaver LC, Dekaban GA (2002) The N-methyl-D-aspartate receptor splice variant NR1-4 C-terminal domain. Deletion analysis and role in subcellular distribution. *The Journal of biological chemistry* 277:1457-1468.
- Hollmann M, Boulter J, Maron C, Heinemann S (1994) Molecular biology of glutamate receptors. Potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor splice variants by zinc. *Renal physiology and biochemistry* 17:182-183.
- Hong H, Zeng JS, Kreulen DL, Kaufman DI, Chen AF (2006) Atorvastatin protects against cerebral infarction via inhibition of NADPH oxidase-derived superoxide in ischemic stroke. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H2210-2215.
- Hou ST, Jiang SX, Aylsworth A, Ferguson G, Slinn J, Hu H, Leung T, Kappler J, Kaibuchi K (2009) CaMKII phosphorylates collapsin response mediator protein 2 and modulates axonal damage during glutamate excitotoxicity. *Journal of neurochemistry* 111:870-881.
- Houle F, Poirier A, Dumaresq J, Huot J (2007) DAP kinase mediates the phosphorylation of tropomyosin-1 downstream of the ERK pathway, which regulates the formation of stress fibers in response to oxidative stress. *Journal of cell science* 120:3666-3677.
- Hoyt KR, Reynolds IJ (1998) Alkalinization prolongs recovery from glutamate-induced increases in intracellular Ca²⁺ concentration by enhancing Ca²⁺ efflux through the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger in cultured rat forebrain neurons. *Journal of neurochemistry* 71:1051-1058.

- Hughes JL, Beech JS, Jones PS, Wang D, Menon DK, Baron JC (2010) Mapping selective neuronal loss and microglial activation in the salvaged neocortical penumbra in the rat. *NeuroImage* 49:19-31.
- Huo XL, Min JJ, Pan CY, Zhao CC, Pan LL, Gui FF, Jin L, Wang XT (2014) Efficacy of lovastatin on learning and memory deficits caused by chronic intermittent hypoxia-hypercapnia: through regulation of NR2B-containing NMDA receptor-ERK pathway. *PLoS one* 9:e94278.
- Hussein RM, Hashem RM, Rashed LA (2015) Evaluation of the amyloid beta-GFP fusion protein as a model of amyloid beta peptides-mediated aggregation: a study of DNAJB6 chaperone. *Frontiers in molecular neuroscience* 8:40.
- Iadecola C, Gorelick PB (2005) The Janus face of cyclooxygenase-2 in ischemic stroke: shifting toward downstream targets. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 36:182-185.
- Ikonomidou C, Stefovskaja V, Turski L (2000) Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:12885-12890.
- Impey S, Fong AL, Wang Y, Cardinaux JR, Fass DM, Obrietan K, Wayman GA, Storm DR, Soderling TR, Goodman RH (2002) Phosphorylation of CBP mediates transcriptional activation by neural activity and CaM kinase IV. *Neuron* 34:235-244.
- Inagaki N, Chihara K, Arimura N, Menager C, Kawano Y, Matsuo N, Nishimura T, Amano M, Kaibuchi K (2001) CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nature neuroscience* 4:781-782.
- Inbal B, Bialik S, Sabanay I, Shani G, Kimchi A (2002) DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol* 157:455-468.
- Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, Kopolovic J, Vadai E, Eisenbach L, Kimchi A (1997) DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* 390:180-184.
- Inbal B, Shani G, Cohen O, Kissil JL, Kimchi A (2000) Death-associated protein kinase-related protein 1, a novel serine/threonine kinase involved in apoptosis. *Mol Cell Biol* 20:1044-1054.
- Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M, et al. (1993) Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *The Journal of biological chemistry* 268:2836-2843.
- Istvan ES (2002) Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *American heart journal* 144:S27-32.
- Ivanov A, Pellegrino C, Rama S, Dumalska I, Salyha Y, Ben-Ari Y, Medina I (2006) Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *The Journal of physiology* 572:789-798.
- J T (1988) The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators. *Journal of clinical epidemiology* 41:105-114.

- Jackson A, Sanger DJ (1988) Is the discriminative stimulus produced by phencyclidine due to an interaction with N-methyl-D-aspartate receptors? *Psychopharmacology* 96:87-92.
- Jacobsen W, Kuhn B, Soldner A, Kirchner G, Sewing KF, Kollman PA, Benet LZ, Christians U (2000) Lactonization is the critical first step in the disposition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 28:1369-1378.
- Jana NR, Tanaka M, Wang G, Nukina N (2000) Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. *Human molecular genetics* 9:2009-2018.
- Jeanneteau F, Diaz J, Sokoloff P, Griffon N (2004) Interactions of GIPC with dopamine D2, D3 but not D4 receptors define a novel mode of regulation of G protein-coupled receptors. *Mol Biol Cell* 15:696-705.
- Jiang SX, Kappler J, Zurakowski B, Desbois A, Aylsworth A, Hou ST (2007) Calpain cleavage of collapsin response mediator proteins in ischemic mouse brain. *The European journal of neuroscience* 26:801-809.
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA (2001) Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:4710-4715.
- Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Zhu W, Wang Y, Shen J, Mao Y, Banwait S, Greenberg DA (2006) Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:13198-13202.
- Jin Y, Blue EK, Dixon S, Shao Z, Gallagher PJ (2002) A death-associated protein kinase (DAPK)-interacting protein, DIP-1, is an E3 ubiquitin ligase that promotes tumor necrosis factor-induced apoptosis and regulates the cellular levels of DAPK. *The Journal of biological chemistry* 277:46980-46986.
- Jones ML, Leonard JP (2005) PKC site mutations reveal differential modulation by insulin of NMDA receptors containing NR2A or NR2B subunits. *Journal of neurochemistry* 92:1431-1438.
- Jones PH (2003) Achieving cholesterol goals. *Current and future drug therapies. Postgrad Med* 114:14-21.
- Jovin TG, Chamorro A, Cobo E, de Miquel MA, Molina CA, Rovira A, San Roman L, Serena J, Abilleira S, Ribo M, Millan M, Urra X, Cardona P, Lopez-Cancio E, Tomasello A, Castano C, Blasco J, Aja L, Dorado L, Quesada H, Rubiera M, Hernandez-Perez M, Goyal M, Demchuk AM, von Kummer R, Gallofre M, Davalos A, Investigators RT (2015) Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *The New England journal of medicine* 372:2296-2306.
- Kang BN, Ahmad AS, Saleem S, Patterson RL, Hester L, Dore S, Snyder SH (2010) Death-associated protein kinase-mediated cell death modulated by interaction with DANGER. *J Neurosci* 30:93-98.
- Kang C, Avery L (2008) To be or not to be, the level of autophagy is the question: dual roles of autophagy in the survival response to starvation. *Autophagy* 4:82-84.

- Kantola T, Kivisto KT, Neuvonen PJ (1998) Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of atorvastatin. *Clinical pharmacology and therapeutics* 64:58-65.
- Kato-Negishi M, Muramoto K, Kawahara M, Kuroda Y, Ichikawa M (2004) Developmental changes of GABAergic synapses formed between primary cultured cortical neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 152:99-108.
- Kato M (2002) GIPC gene family (Review). *International journal of molecular medicine* 9:585-589.
- Kato M (2013) Functional proteomics, human genetics and cancer biology of GIPC family members. *Exp Mol Med* 45:e26.
- Katsura K, Kristian T, Siesjo BK (1994) Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochemical Society transactions* 22:991-996.
- Kaufman AM, Milnerwood AJ, Sepers MD, Coquinco A, She K, Wang L, Lee H, Craig AM, Cynader M, Raymond LA (2012) Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptor signaling in cocultured striatal and cortical neurons. *J Neurosci* 32:3992-4003.
- Kaur H, Prakash A, Medhi B (2013) Drug therapy in stroke: from preclinical to clinical studies. *Pharmacology* 92:324-334.
- Kelly PJ, Morrow JD, Ning M, Koroshetz W, Lo EH, Terry E, Milne GL, Hubbard J, Lee H, Stevenson E, Lederer M, Furie KL (2008) Oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 in acute ischemic stroke: the Biomarker Evaluation for Antioxidant Therapies in Stroke (BEAT-Stroke) study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39:100-104.
- Kennedy MB (1997) The postsynaptic density at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci*; 20:264-8
- Kim E, Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nature reviews* 5:771-781.
- Kim E, Ko J (2006) Molecular organization and assembly of the postsynaptic density of excitatory brain synapses. *Results Probl Cell Differ*;43:1-23
- Kim MJ, Dunah AW, Wang YT, Sheng M (2005) Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron* 46:745-760.
- Kinney JW, Davis CN, Tabarean I, Conti B, Bartfai T, Behrens MM (2006) A specific role for NR2A-containing NMDA receptors in the maintenance of parvalbumin and GAD67 immunoreactivity in cultured interneurons. *J Neurosci* 26:1604-1615.
- Kiss JP, Szasz BK, Fodor L, Mike A, Lenkey N, Kurko D, Nagy J, Vizi ES (2012) GluN2B-containing NMDA receptors as possible targets for the neuroprotective and antidepressant effects of fluoxetine. *Neurochemistry international* 60:170-176.
- Kjeldsen SE, Julius S, Hedner T, Hansson L (2001) Stroke is more common than myocardial infarction in hypertension: analysis based on 11 major randomized intervention trials. *Blood pressure* 10:190-192.
- Koh PO (2011) Focal Cerebral Ischemia Reduces Protein Phosphatase 2A Subunit B Expression in Brain Tissue and HT22 Cells. *Laboratory animal research* 27:73-76.
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269:1737-1740.

- Kostandy BB (2012) The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 33:223-237.
- Koton S, Tashlykov V, Schwammenthal Y, Molshatzki N, Merzeliak O, Tsabari R, Tanne D (2012) Cerebral artery calcification in patients with acute cerebrovascular diseases: determinants and long-term clinical outcome. *Eur J Neurol* 19:739-745.
- Krapivinsky G, Krapivinsky L, Manasian Y, Ivanov A, Tyzio R, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Clapham DE, Medina I (2003) The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron* 40:775-784.
- Kristian T, Siesjo BK (1998) Calcium in ischemic cell death. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 29:705-718.
- Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM (1994) Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 25:1794-1798.
- Krupp JJ, Vissel B, Thomas CG, Heinemann SF, Westbrook GL (1999) Interactions of calmodulin and alpha-actinin with the NR1 subunit modulate Ca²⁺-dependent inactivation of NMDA receptors. *J Neurosci* 19:1165-1178.
- Kuo JC, Lin JR, Staddon JM, Hosoya H, Chen RH (2003) Uncoordinated regulation of stress fibers and focal adhesions by DAP kinase. *Journal of cell science* 116:4777-4790.
- Kurata T, Miyazaki K, Morimoto N, Kawai H, Ohta Y, Ikeda Y, Abe K (2013) Atorvastatin and pitavastatin reduce oxidative stress and improve IR/LDL-R signals in Alzheimer's disease. *Neurol Res* 35:193-205.
- Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M, et al. (1992) Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 358:36-41.
- Lafon-Cazal M, Perez V, Bockaert J, Marin P (2002) Akt mediates the anti-apoptotic effect of NMDA but not that induced by potassium depolarization in cultured cerebellar granule cells. *The European journal of neuroscience* 16:575-583.
- Lai TW, Zhang S, Wang YT (2014) Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in neurobiology* 115:157-188.
- Lamp I, Lorberboym M, Gilad R, Vysberg I, Tikozky A, Sadeh M, Boaz M (2010) Early outcome of acute ischemic stroke in hyperlipidemic patients under atorvastatin versus simvastatin. *Clin Neuropharmacol* 33:129-134.
- 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* 29:4420-4429.
- Lau YY, Okochi H, Huang Y, Benet LZ (2006) Pharmacokinetics of atorvastatin and its hydroxy metabolites in rats and the effects of concomitant rifampicin single doses: relevance of first-pass effect from hepatic uptake transporters, and intestinal and hepatic metabolism. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 34:1175-1181.

- Laufs U, Liao JK (2000) Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends in cardiovascular medicine* 10:143-148.
- Laufs U, Liao JK (2003) Isoprenoid metabolism and the pleiotropic effects of statins. *Current atherosclerosis reports* 5:372-378.
- Laurie DJ, Bartke I, Schoepfer R, Naujoks K, Seeburg PH (1997) Regional, developmental and interspecies expression of the four NMDAR2 subunits, examined using monoclonal antibodies. *Brain Res Mol Brain Res* 51:23-32.
- Lavezzari G, McCallum J, Lee R, Roche KW (2003) Differential binding of the AP-2 adaptor complex and PSD-95 to the C-terminus of the NMDA receptor subunit NR2B regulates surface expression. *Neuropharmacology* 45:729-737.
- Lea AP, McTavish D (1997) Atorvastatin. A review of its pharmacology and therapeutic potential in the management of hyperlipidaemias. *Drugs* 53:828-847.
- Lechward K, Awotunde OS, Swiatek W, Muszynska G (2001) Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions. *Acta Biochim Pol* 48:921-33.
- Lee B, Butcher GQ, Hoyt KR, 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* 25:1137-1148.
- Lee KS, Frank S, Vanderklish P, Arai A, Lynch G (1991) Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:7233-7237.
- Lee TH, Chen CH, Suizu F, Huang P, Schiene-Fischer C, Daum S, Zhang YJ, Goate A, Chen RH, Zhou XZ, Lu KP (2011) Death-associated protein kinase 1 phosphorylates Pin1 and inhibits its prolyl isomerase activity and cellular function. *Mol Cell* 42:147-159.
- Lee YR, Yuan WC, Ho HC, Chen CH, Shih HM, Chen RH (2010) The Cullin 3 substrate adaptor KLHL20 mediates DAPK ubiquitination to control interferon responses. *EMBO J* 29:1748-1761.
- Lees KR, Asplund K, Carolei A, Davis SM, Diener HC, Kaste M, Orgogozo JM, Whitehead J (2000) Glycine antagonist (gavestinel) in neuroprotection (GAIN International) in patients with acute stroke: a randomised controlled trial. *GAIN International Investigators*. 355:1949-54
- Lees KR, Lavelle JF, Cunha L, Diener HC, Sanders EA, Tack P, Wester P, Group GPIES (2001) Glycine antagonist (GV150526) in acute stroke: a multicentre, double-blind placebo-controlled phase II trial. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 11:20-29.
- Lei ZN, Zhang LM, Sun FY (2008) Beta-catenin siRNA inhibits ischemia-induced striatal neurogenesis in adult rat brain following a transient middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience letters* 435:108-112.
- Lennernas H (2003) Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. *Clinical pharmacokinetics* 42:1141-1160.
- Lepinoux-Chambaud C, Eyer J (2013) Review on intermediate filaments of the nervous system and their pathological alterations. *Histochemistry and cell biology* 140:13-22.

- Lesuisse C, Martin LJ (2002) Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death. *Journal of neurobiology* 51:9-23.
- Leveille F, El Gaamouch F, Gouix E, Lecocq M, Lobner D, Nicole O, Buisson A (2008) Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB J* 22:4258-4271.
- Leveille F, Papadia S, Fricker M, Bell KF, Soriano FX, Martel MA, Puddifoot C, Habel M, Wyllie DJ, Ikonomidou C, Tolkovsky AM, Hardingham GE (2010) Suppression of the intrinsic apoptosis pathway by synaptic activity. *J Neurosci* 30:2623-2635.
- Li S, Tian X, Hartley DM, Feig LA (2006) Distinct roles for Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) and Ras-GRF2 in the induction of long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci* 26:1721-1729.
- Li WL, Yu SP, Chen D, Yu SS, Jiang YJ, Genetta T, Wei L (2013) The regulatory role of NF-kappaB in autophagy-like cell death after focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience* 244:16-30.
- Liao GY, Wagner DA, Hsu MH, Leonard JP (2001) Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-D-aspartate receptor current. *Molecular pharmacology* 59:960-964.
- Lin SY, Wu K, Len GW, Xu JL, Levine ES, Suen PC, Mount HT, Black IB (1999) Brain-derived neurotrophic factor enhances association of protein tyrosine phosphatase PTP1D with the NMDA receptor subunit NR2B in the cortical postsynaptic density. *Brain Res Mol Brain Res* 70:18-25.
- Lin Y, Stevens C, Hupp T (2007) Identification of a dominant negative functional domain on DAPK-1 that degrades DAPK-1 protein and stimulates TNFR-1-mediated apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 282:16792-16802.
- Lins RL, Matthys KE, Verpooten GA, Peeters PC, Dratwa M, Stolear JC, Lameire NH (2003) Pharmacokinetics of atorvastatin and its metabolites after single and multiple dosing in hypercholesterolaemic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 18:967-976.
- Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological reviews* 79:1431-1568.
- Lipton SA, Nakanishi N (1999) Shakespeare in love--with NMDA receptors? *Nat Med* 5:270-271.
- Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *The New England journal of medicine* 330:613-622.
- Liu J, Bang AG, Kintner C, Orth AP, Chanda SK, Ding S, Schultz PG (2005) Identification of the Wnt signaling activator leucine-rich repeat in Flightless interaction protein 2 by a genome-wide functional analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:1927-1932.
- Liu XB, Murray KD, Jones EG (2004) Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *J Neurosci* 24:8885-8895.
- Liu XY, Chu XP, Mao LM, Wang M, Lan HX, Li MH, Zhang GC, Parelkar NK, Fibuch EE, Haines M, Neve KA, Liu F, Xiong ZG, Wang JQ (2006) Modulation of D2R-NR2B interactions in response to cocaine. *Neuron* 52:897-909.

- Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyackers A, Liu L, Lai TW, Wu DC, Lu J, Tymianski M, Craig AM, Wang YT (2007) NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* 27:2846-2857.
- Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA (2003) Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nature reviews* 4:399-415.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 20:84-91.
- Lonze BE, Riccio A, Cohen S, Ginty DD (2002) Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron* 34:371-385.
- Lou X, Yano H, Lee F, Chao MV, Farquhar MG (2001) GIPC and GAIP form a complex with TrkA: a putative link between G protein and receptor tyrosine kinase pathways. *Mol Biol Cell* 12:615-627.
- Low CM, Wee KS (2010) New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-aspartate receptor: localization, structure, and function. *Molecular pharmacology* 78:1-11.
- Lu C, Fu Z, Karavanov I, Yasuda RP, Wolfe BB, Buonanno A, Vicini S (2006) NMDA receptor subtypes at autaptic synapses of cerebellar granule neurons. *Journal of neurophysiology* 96:2282-2294.
- Lujan B, Liu X, Wan Q (2012) Differential roles of GluN2A- and GluN2B-containing NMDA receptors in neuronal survival and death. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 4:211-218.
- Luo J, Bosy TZ, Wang Y, Yasuda RP, Wolfe BB (1996) Ontogeny of NMDA R1 subunit protein expression in five regions of rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 92:10-17.
- Lynch DR, Guttman RP (2001) NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. *Current drug targets* 2:215-231.
- Lynch DR, Guttman RP (2002) Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 300:717-723.
- Llambi F, Lourenco FC, Gozuacik D, Guix C, Pays L, Del Rio G, Kimchi A, Mehlen P (2005) The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *EMBO J* 24:1192-1201.
- Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, Ford E, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M, Meigs J, Mozaffarian D, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong N, Wylie-Rosett J, Hong Y, American Heart Association Statistics C, Stroke Statistics S (2009) Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 119:480-486.
- Mallolas J, Hurtado O, Castellanos M, Blanco M, Sobrino T, Serena J, Vivancos J, Castillo J, Lizasoain I, Moro MA, Davalos A (2006) A polymorphism in the EAAT2 promoter is associated with higher glutamate concentrations and

- higher frequency of progressing stroke. *The Journal of experimental medicine* 203:711-717.
- Manders EM, Stap J, Brakenhoff GJ, van Driel R, Aten JA (1992) Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *Journal of cell science* 103 (Pt 3):857-862.
- Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, Kern H, Kretz O, Martin Villalba A, Tronche F, Kellendonk C, Gau D, Kapfhammer J, Otto C, Schmid W, Schutz G (2002) Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nature genetics* 31:47-54.
- Mao L, Jia J, Zhou X, Xiao Y, Wang Y, Mao X, Zhen X, Guan Y, Alkayed NJ, Cheng J (2013) Delayed administration of a PTEN inhibitor BPV improves functional recovery after experimental stroke. *Neuroscience* 231:272-281.
- Mao LM, Jin DZ, Xue B, Chu XP, Wang JQ (2014) Phosphorylation and regulation of glutamate receptors by CaMKII. *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]* 66:365-372.
- Martel MA, Ryan TJ, Bell KF, Fowler JH, McMahon A, Al-Mubarak B, Komiyama NH, Horsburgh K, Kind PC, Grant SG, Wyllie DJ, Hardingham GE (2012) The subtype of GluN2 C-terminal domain determines the response to excitotoxic insults. *Neuron* 74:543-556.
- Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI (1994) The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends in neurosciences* 17:251-257.
- Martínez-Vila E MMF, I. Pagola y P. Irimia (2011) Enfermedades cerebrovasculares. *Medicine* 10:10.
- Masjuan J, Alvarez-Sabin J, Arenillas J, Calleja S, Castillo J, Davalos A, Diez Tejedor E, Freijo M, Gil-Nunez A, Fernandez JC, Maestre JF, Martinez-Vila E, Morales A, Purroy F, Ramirez JM, Segura T, Serena J, Tejada J, Tejero C (2011) [Stroke health care plan (ICTUS II. 2010)]. *Neurologia* 26:383-396.
- Mason RP (2006) Molecular basis of differences among statins and a comparison with antioxidant vitamins. *The American journal of cardiology* 98:34P-41P.
- Mason RP, Walter MF, Day CA, Jacob RF (2006) Active metabolite of atorvastatin inhibits membrane cholesterol domain formation by an antioxidant mechanism. *The Journal of biological chemistry* 281:9337-9345.
- Matsuda K, Fletcher M, Kamiya Y, Yuzaki M (2003) Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *J Neurosci* 23:10064-10073.
- Matsuda K, Kamiya Y, Matsuda S, Yuzaki M (2002) Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res Mol Brain Res* 100:43-52.
- Mattle HP, Arnold M, Georgiadis D, Baumann C, Nedeltchev K, Benninger D, Remonda L, von Budingen C, Diana A, Pangalu A, Schroth G, Baumgartner RW (2008) Comparison of intraarterial and intravenous thrombolysis for ischemic stroke with hyperdense middle cerebral artery sign. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39:379-383.
- McCracken E, Graham DI, Nilsen M, Stewart J, Nicoll JA, Horsburgh K (2001) 4-Hydroxynonenal immunoreactivity is increased in human hippocampus after global ischemia. *Brain pathology* 11:414-421.

- Mehta SL, Manhas N, Raghuram R (2007) Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain research reviews* 54:34-66.
- Meller R, Minami M, Cameron JA, Impey S, Chen D, Lan JQ, Henshall DC, Simon RP (2005) CREB-mediated Bcl-2 protein expression after ischemic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:234-246.
- Michaelis EK (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in neurobiology* 54:369-415.
- Michie AM, McCaig AM, Nakagawa R, Vukovic M (2010) Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: regulation in cancer. *The FEBS journal* 277:74-80.
- Mishizen-Eberz AJ, Rissman RA, Carter TL, Ikonovic MD, Wolfe BB, Armstrong DM (2004) Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiology of disease* 15:80-92.
- Moghaddam B, Jackson ME (2003) Glutamatergic animal models of schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1003:131-137.
- Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribo M, Quintana M, Alvarez-Sabin J (2003) Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 107:598-603.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.
- Mor I, Carlessi R, Ast T, Feinstein E, Kimchi A (2012) Death-associated protein kinase increases glycolytic rate through binding and activation of pyruvate kinase. *Oncogene* 31:683-693.
- Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354:31-37.
- Moro MA, Almeida A, Bolanos JP, Lizasoain I (2005) Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free radical biology & medicine* 39:1291-1304.
- Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C (2010) The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67:181-198.
- Mukhopadhyay R, Ray PS, Arif A, Brady AK, Kinter M, Fox PL (2008) DAPK-ZIPK-L13a axis constitutes a negative-feedback module regulating inflammatory gene expression. *Mol Cell* 32:371-382.
- N. García-Barragan J (2012) Enfermedad cerebrovascular. Ictus aterotrombótico. Ictus lacunar. Ruiz JS, editor *Control Global del riesgo cardiometabólico* 1:12.
- Naccache SN, Hasson T, Horowitz A (2006) Binding of internalized receptors to the PDZ domain of GIPC/syneclin recruits myosin VI to endocytic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:12735-12740.
- Nagaraja TN, Knight RA, Croxen RL, Konda KP, Fenstermacher JD (2006) Acute neurovascular unit protection by simvastatin in transient cerebral ischemia. *Neurol Res* 28:826-830.

- Nair S, Hagberg H, Krishnamurthy R, Thornton C, Mallard C (2013) Death associated protein kinases: molecular structure and brain injury. *International journal of molecular sciences* 14:13858-13872.
- Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597-603.
- Nakazawa T, Komai S, Tezuka T, Hisatsune C, Umemori H, Semba K, Mishina M, Manabe T, Yamamoto T (2001) Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR epsilon 2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *The Journal of biological chemistry* 276:693-699.
- National Institutes of Health (1985) Guide for the care and use of Laboratory Animal, 85-23.
- Newpher TM, Ehlers MD (2009) Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. *Trends in cell biology* 19:218-227.
- Nicholls DG, Johnson-Cadwell L, Vesce S, Jakobsons M, Yadava N (2007) Bioenergetics of mitochondria in cultured neurons and their role in glutamate excitotoxicity. *J Neurosci Res* 85:3206-3212.
- Niethammer M, Kim E, Sheng M (1996) Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci* 16:2157-2163.
- Niki E (2009) Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free radical biology & medicine* 47:469-484.
- Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C (1997) Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci* 17:2746-2755.
- Noshita N, Lewen A, Sugawara T, Chan PH (2001) Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1442-1450.
- Noshita N, Sugawara T, Lewen A, Hayashi T, Chan PH (2003) Copper-zinc superoxide dismutase affects Akt activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 34:1513-1518.
- O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Howells DW (2012) Evaluation of combination therapy in animal models of cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:585-597.
- O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, Rangarajan S, Islam S, Pais P, McQueen MJ, Mondo C, Damasceno A, Lopez-Jaramillo P, Hankey GJ, Dans AL, Yusuf K, Truelsen T, Diener HC, Sacco RL, Ryglewicz D, Czlankowska A, Weimar C, Wang X, Yusuf S, investigators I (2010) Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet* 376:112-123.
- Ohtsuka H, Oikawa M, Ariake K, Rikiyama T, Motoi F, Katayose Y, Unno M, Johnson AC (2011) GC-binding factor 2 interacts with dishevelled and regulates Wnt signaling pathways in human carcinoma cell lines. *International journal of cancer Journal international du cancer* 129:1599-1610.
- Okabe S (2007) Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Mol Cell Neurosci* 34:503-518.
- Oku N, Kashiwagi T, Hatazawa J (2010) Nuclear neuroimaging in acute and subacute ischemic stroke. *Annals of nuclear medicine* 24:629-638.
- Olney JW (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164:719-721.

- Otmakhov N, Tao-Cheng JH, Carpenter S, Asrican B, Dosemeci A, Reese TS, Lisman J (2004) Persistent accumulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dendritic spines after induction of NMDA receptor-dependent chemical long-term potentiation. *J Neurosci* 24:9324-9331.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in neurobiology* 54:581-618.
- Paciaroni M, Hennerici M, Agnelli G, Bogouslavsky J (2007) Statins and stroke prevention. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 24:170-182.
- Papadakis M, Hawkins LM, Stephenson FA (2004) Appropriate NR1-NR1 disulfide-linked homodimer formation is requisite for efficient expression of functional, cell surface N-methyl-D-aspartate NR1/NR2 receptors. *The Journal of biological chemistry* 279:14703-14712.
- Papadia S, Soriano FX, Leveille F, Martel MA, Dakin KA, Hansen HH, Kaindl A, Sifringer M, Fowler J, Stefovskaja V, McKenzie G, Craighan M, Corriveau R, Ghazal P, Horsburgh K, Yankner BA, Wyllie DJ, Ikonomidou C, Hardingham GE (2008) Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nature neuroscience* 11:476-487.
- Papadia S, Stevenson P, Hardingham NR, Bading H, Hardingham GE (2005) Nuclear Ca²⁺ and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J Neurosci* 25:4279-4287.
- Papouin T, Ladepeche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, Groc L, Pollegioni L, Mothet JP, Oliet SH (2012) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 150:633-646.
- Patra CR, Rupasinghe CN, Dutta SK, Bhattacharya S, Wang E, Spaller MR, Mukhopadhyay D (2012) Chemically modified peptides targeting the PDZ domain of GIPC as a therapeutic approach for cancer. *ACS Chem Biol* 7:770-779.
- Pei L, Shang Y, Jin H, Wang S, Wei N, Yan H, Wu Y, Yao C, Wang X, Zhu LQ, Lu Y (2014) DAPK1-p53 interaction converges necrotic and apoptotic pathways of ischemic neuronal death. *J Neurosci* 34:6546-6556.
- Pelled D, Raveh T, Riebeling C, Fridkin M, Berissi H, Futerman AH, Kimchi A (2002) Death-associated protein (DAP) kinase plays a central role in ceramide-induced apoptosis in cultured hippocampal neurons. *The Journal of biological chemistry* 277:1957-1961.
- Perez-Otano I, Lujan R, Tavalin SJ, Plomann M, Modregger J, Liu XB, Jones EG, Heinemann SF, Lo DC, Ehlers MD (2006) Endocytosis and synaptic removal of NR3A-containing NMDA receptors by PACSIN1/syndapin1. *Nature neuroscience* 9:611-621.
- Perez de la Ossa-Herrero N (2008) [Early access to stroke referral centres offers clinical benefits: the stroke code]. *Revista de neurologia* 47:427-433.
- Pfefferkorn T, Mayer TE, Opherck C, Peters N, Straube A, Pfister HW, Holtmannspotter M, Muller-Schunk S, Wiesmann M, Dichgans M (2008) Staged escalation therapy in acute basilar artery occlusion: intravenous thrombolysis and on-demand consecutive endovascular mechanical thrombectomy: preliminary experience in 16 patients. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39:1496-1500.
- Pinal CS, Tobin AJ (1998) Uniqueness and redundancy in GABA production. *Perspectives on developmental neurobiology* 5:109-118.

- Plattner F, Hernandez A, Kistler TM, Pozo K, Zhong P, Yuen EY, Tan C, Hawasli AH, Cooke SF, Nishi A, Guo A, Wiederhold T, Yan Z, Bibb JA (2014) Memory enhancement by targeting Cdk5 regulation of NR2B. *Neuron* 81:1070-1083.
- Poddar R, Deb I, Mukherjee S, Paul S (2010) NR2B-NMDA receptor mediated modulation of the tyrosine phosphatase STEP regulates glutamate induced neuronal cell death. *Journal of neurochemistry* 115:1350-1362.
- Ponce J, de la Ossa NP, Hurtado O, Millan M, Arenillas JF, Davalos A, Gasull T (2008) Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: a cholesterol-mediated effect in neuroprotection. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39:1269-1275.
- Prabhu Ramya R, Suma Priya S, Mayadevi M, Omkumar RV (2012) Regulation of phosphorylation at Ser(1303) of GluN2B receptor in the postsynaptic density. *Neurochemistry international* 61:981-985.
- Prakash P, Khanna V, Singh V, Jyoti A, Jain M, Keshari RS, Barthwal MK, Dikshit M (2011) Atorvastatin protects against ischemia-reperfusion injury in fructose-induced insulin resistant rats. *Cardiovasc Drugs Ther* 25:285-297.
- Priller J, Flugel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernandez-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U (2001) Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 7:1356-1361.
- Prinz V, Laufs U, Gertz K, Kronenberg G, Balkaya M, Leithner C, Lindauer U, Endres M (2008) Intravenous rosuvastatin for acute stroke treatment: an animal study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39:433-438.
- Prybylowski K, Chang K, Sans N, Kan L, Vicini S, Wenthold RJ (2005) The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. *Neuron* 47:845-857.
- Pulsinelli W (1992) Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet* 339:533-536.
- Puyal J, Ginet V, Grishchuk Y, Truttmann AC, Clarke PG (2012) Neuronal autophagy as a mediator of life and death: contrasting roles in chronic neurodegenerative and acute neural disorders. *Neuroscientist* 18:224-36
- Qin AP, Zhang HL, Qin ZH (2008) Mechanisms of lysosomal proteases participating in cerebral ischemia-induced neuronal death. *Neurosci Bull* 24:117-123.
- Rami A (2009) Review: autophagy in neurodegeneration: firefighter and/or incendiary? *Neuropathology and applied neurobiology* 35:449-461.
- Rauner C, Kohr G (2011) Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors constitute the major N-methyl-D-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses. *The Journal of biological chemistry* 286:7558-7566.
- Raveh T, Kimchi A (2001) DAP kinase—a proapoptotic gene that functions as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 264:185-192.
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC (2010) Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* 90:1383-1435.
- Reinoso RF, Sanchez Navarro A, Garcia MJ, Prous JR (2002) Preclinical pharmacokinetics of statins. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 24:593-613.

- Rha JH, Saver JL (2007) The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 38:967-973.
- Roche KW, Standley S, McCallum J, Dune Ly C, Ehlers MD, Wenthold RJ (2001) Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nature neuroscience* 4:794-802.
- Rodriguez-Yanez M, Agulla J, Rodriguez-Gonzalez R, Sobrino T, Castillo J (2008) Statins and stroke. *Therapeutic advances in cardiovascular disease* 2:157-166.
- Rodriguez-Yanez M, Sobrino T, Arias S, Vazquez-Herrero F, Brea D, Blanco M, Leira R, Castellanos M, Serena J, Vivancos J, Davalos A, Castillo J (2011) Early biomarkers of clinical-diffusion mismatch in acute ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 42:2813-2818.
- Rönike R, Mikhaylova M, Rönike S, Meinhardt J, Schröder UH, Fändrich M, Reiser G, Kreutz MR, Reymann KG (2010) Early neuronal dysfunction by amyloid β oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiol Aging* 32:2219-28
- Rosales-Hernandez A, Beck KE, Zhao X, Braun AP, Braun JE (2009) RDJ2 (DNAJA2) chaperones neural G protein signaling pathways. *Cell stress & chaperones* 14:71-82.
- Roth BD (2002) The discovery and development of atorvastatin, a potent novel hypolipidemic agent. *Progress in medicinal chemistry* 40:1-22.
- Rothman SM, Olney JW (1986) Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage. *Annals of neurology* 19:105-111.
- Ruan L, Wang B, ZhuGe Q, Jin K (2015) Coupling of neurogenesis and angiogenesis after ischemic stroke. *Brain research* 1623:166-173.
- Rudolph JG, Lemasters JJ, Crews FT (1997) Use of a multiwell fluorescence scanner with propidium iodide to assess NMDA mediated excitotoxicity in rat cortical neuronal cultures. *Neuroscience letters* 221:149-152.
- Sabogal AM, Arango CA, Cardona GP, Cespedes AE (2014) Atorvastatin protects GABAergic and dopaminergic neurons in the nigrostriatal system in an experimental rat model of transient focal cerebral ischemia. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud* 34:207-217.
- Sacco RL, DeRosa JT, Haley EC Jr, Levin B, Ordroneau P, Phillips SJ, Rundek T, Snipes RG, Thompson JL; Glycine Antagonist in Neuroprotection Americas Investigators. (2001) Glycine antagonist in neuroprotection for patients with acute stroke: GAIN Americas: a randomized controlled trial. *JAMA* 285(13):1719-28.
- Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y, Sugiyama H, et al. (1995) Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* 373:151-155.
- Sans N, Petralia RS, Wang YX, Blahos J, 2nd, Hell JW, Wenthold RJ (2000) A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J Neurosci* 20:1260-1271.
- Sanz-Clemente A, Matta JA, Isaac JT, Roche KW (2010) Casein kinase 2 regulates the NR2 subunit composition of synaptic NMDA receptors. *Neuron* 67:984-996.
- Sanz-Clemente A, Nicoll RA, Roche KW (2013) Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *Neuroscientist* 19:62-75.

- Sapkota GP (2013) The TGFbeta-induced phosphorylation and activation of p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by MAP3K4 and MAP3K10 but not TAK1. *Open biology* 3:130067.
- Sasaki T, Takemori H, Yagita Y, Terasaki Y, Uebi T, Horike N, Takagi H, Susumu T, Teraoka H, Kusano K, Hatano O, Oyama N, Sugiyama Y, Sakoda S, Kitagawa K (2011) SIK2 is a key regulator for neuronal survival after ischemia via TORC1-CREB. *Neuron* 69:106-119.
- Sattler R, Charlton MP, Hafner M, Tymianski M. (1998) Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *J Neurochem* 71(6):2349-64.
- Sattler R, Xiong Z, Lu WY, MacDonald JF, Tymianski M (2000) Distinct roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in excitotoxicity. *J Neurosci* 20:22-33.
- Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener HC, Levy EI, Pereira VM, Albers GW, Cognard C, Cohen DJ, Hacke W, Jansen O, Jovin TG, Mattle HP, Nogueira RG, Siddiqui AH, Yavagal DR, Baxter BW, Devlin TG, Lopes DK, Reddy VK, du Mesnil de Rochemont R, Singer OC, Jahan R, Investigators SP (2015) Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *The New England journal of medicine* 372:2285-2295.
- Savoia C, Sisalli MJ, Di Renzo G, Annunziato L, Scorziello A (2011) Rosuvastatin-induced neuroprotection in cortical neurons exposed to OGD/reoxygenation is due to nitric oxide inhibition and ERK1/2 pathway activation. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 3:57-64.
- Schorge S, Colquhoun D (2003) Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci* 23:1151-1158.
- Schuler T, Mesic I, Madry C, Bartholomaeus I, Laube B (2008) Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. *The Journal of biological chemistry* 283:37-46.
- Schulz JG, Bosel J, Stoeckel M, Megow D, Dirnagl U, Endres M (2004) HMG-CoA reductase inhibition causes neurite loss by interfering with geranylgeranylpyrophosphate synthesis. *Journal of neurochemistry* 89:24-32.
- Schumacher AM, Schavocky JP, Velentza AV, Mirzoeva S, Watterson DM (2004) A calmodulin-regulated protein kinase linked to neuron survival is a substrate for the calmodulin-regulated death-associated protein kinase. *Biochemistry* 43:8116-8124.
- Schumacher AM, Velentza AV, Watterson DM (2002a) Death-associated protein kinase as a potential therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 6:497-506.
- Schumacher AM, Velentza AV, Watterson DM, Dresios J (2006) Death-associated protein kinase phosphorylates mammalian ribosomal protein S6 and reduces protein synthesis. *Biochemistry* 45:13614-13621.
- Schumacher AM, Velentza AV, Watterson DM, Wainwright MS (2002b) DAPK catalytic activity in the hippocampus increases during the recovery phase in an animal model of brain hypoxic-ischemic injury. *Biochimica et biophysica acta* 1600:128-137.

- Serra-Perez A, Verdaguer E, Planas AM, Santalucia T (2008) Glucose promotes caspase-dependent delayed cell death after a transient episode of oxygen and glucose deprivation in SH-SY5Y cells. *Journal of neurochemistry* 106:1237-1247.
- Shamloo M, Soriano L, Wieloch T, Nikolich K, Urfer R, Oksenberg D (2005) Death-associated protein kinase is activated by dephosphorylation in response to cerebral ischemia. *The Journal of biological chemistry* 280:42290-42299.
- Shani G, Henis-Korenblit S, Jona G, Gileadi O, Eisenstein M, Ziv T, Admon A, Kimchi A (2001) Autophosphorylation restrains the apoptotic activity of DRP-1 kinase by controlling dimerization and calmodulin binding. *EMBO J* 20:1099-1113.
- Shani G, Marash L, Gozuacik D, Bialik S, Teitelbaum L, Shohat G, Kimchi A (2004) Death-associated protein kinase phosphorylates ZIP kinase, forming a unique kinase hierarchy to activate its cell death functions. *Mol Cell Biol* 24:8611-8626.
- Sheng M (2001) The postsynaptic NMDA-receptor--PSD-95 signaling complex in excitatory synapses of the brain. *Journal of cell science* 114:1251.
- Sheng R, Zhang LS, Han R, Liu XQ, Gao B, Qin ZH (2010) Autophagy activation is associated with neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemic preconditioning. *Autophagy* 6:482-494.
- Shi R, Weng J, Zhao L, Li XM, Gao TM, Kong J (2012) Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia. *CNS Neurosci Ther* 18:250-260.
- Shohat G, Shani G, Eisenstein M, Kimchi A (2002) The DAP-kinase family of proteins: study of a novel group of calcium-regulated death-promoting kinases. *Biochimica et biophysica acta* 1600:45-50.
- Shohat G, Spivak-Kroizman T, Cohen O, Bialik S, Shani G, Berrisi H, Eisenstein M, Kimchi A (2001) The pro-apoptotic function of death-associated protein kinase is controlled by a unique inhibitory autophosphorylation-based mechanism. *The Journal of biological chemistry* 276:47460-47467.
- Siesjo BK, Agardh CD, Bengtsson F (1989) Free radicals and brain damage. *Cerebrovascular and brain metabolism reviews* 1:165-211.
- Siman R, Noszek JC (1988) Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron* 1:279-287.
- Simpkins KL, Guttmann RP, Dong Y, Chen Z, Sokol S, Neumar RW, Lynch DR (2003) Selective activation induced cleavage of the NR2B subunit by calpain. *J Neurosci* 23:11322-11331.
- Sironi L, Cimino M, Guerrini U, Calvio AM, Lodetti B, Asdente M, Balduini W, Paoletti R, Tremoli E (2003) Treatment with statins after induction of focal ischemia in rats reduces the extent of brain damage. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23:322-327.
- Skeberdis VA, Chevalleyre V, Lau CG, Goldberg JH, Pettit DL, Suadicani SO, Lin Y, Bennett MV, Yuste R, Castillo PE, Zukin RS (2006) Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. *Nature neuroscience* 9:501-510.
- Slater DI (2015) Middle Cerebral Artery Stroke. *Medscape; Drugs & Diseases*.
- Smothers CT, Woodward JJ (2007) Pharmacological characterization of glycine-activated currents in HEK 293 cells expressing N-methyl-D-aspartate NR1 and NR3 subunits. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 322:739-748.

- Smyth JW, Zhang SS, Sanchez JM, Lamouille S, Vogan JM, Hesketh GG, Hong T, Tomaselli GF, Shaw RM (2014) A 14-3-3 mode-1 binding motif initiates gap junction internalization during acute cardiac ischemia. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 15:684-699.
- Soriano FX, Martel MA, Papadia S, Vaslin A, Baxter P, Rickman C, Forder J, Tymianski M, Duncan R, Aarts M, Clarke P, Wyllie DJ, Hardingham GE (2008) Specific targeting of pro-death NMDA receptor signals with differing reliance on the NR2B PDZ ligand. *J Neurosci* 28:10696-10710.
- Soriano FX, Papadia S, Hofmann F, Hardingham NR, Bading H, Hardingham GE (2006) Preconditioning doses of NMDA promote neuroprotection by enhancing neuronal excitability. *J Neurosci* 26:4509-4518.
- Sornarajah L, Vasuta OC, Zhang L, Sutton C, Li B, El-Husseini A, Raymond LA (2008) NMDA receptor desensitization regulated by direct binding to PDZ1-2 domains of PSD-95. *Journal of neurophysiology* 99:3052-3062.
- Sprengel R, Suchanek B, Amico C, Brusa R, Burnashev N, Rozov A, Hvalby O, Jensen V, Paulsen O, Andersen P, Kim JJ, Thompson RF, Sun W, Webster LC, Grant SG, Eilers J, Konnerth A, Li J, McNamara JO, Seeburg PH (1998) Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell* 92:279-289.
- Stanika RI, Pivovarova NB, Brantner CA, Watts CA, Winters CA, Andrews SB (2009) Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:9854-9859.
- Starkov AA, Chinopoulos C, Fiskum G (2004) Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. *Cell calcium* 36:257-264.
- Stevens C, Lin Y, Harrison B, Burch L, Ridgway RA, Sansom O, Hupp T (2009) Peptide combinatorial libraries identify TSC2 as a death-associated protein kinase (DAPK) death domain-binding protein and reveal a stimulatory role for DAPK in mTORC1 signaling. *The Journal of biological chemistry* 284:334-344.
- Stocca G, Vicini S (1998) Increased contribution of NR2A subunit to synaptic NMDA receptors in developing rat cortical neurons. *The Journal of physiology* 507 (Pt 1):13-24.
- Stoll G, Jander S, Schroeter M (1998) Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Progress in neurobiology* 56:149-171.
- Strack S, Colbran RJ (1998) Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl- D-aspartate receptor. *The Journal of biological chemistry* 273:20689-20692.
- Strack S, Zaucha JA, Ebner FF, Colbran RJ, Wadzinski BE (1998) Brain protein phosphatase 2A: developmental regulation and distinct cellular and subcellular localization by B subunits. *The Journal of comparative neurology* 392:515-527.
- STRING (2015) Functional protein association networks.
- Struffert T, Kohrmann M, Engelhorn T, Nowe T, Richter G, Schellinger PD, Schwab S, Doerfler A (2009) Penumbra Stroke System as an "add-on" for the treatment of large vessel occlusive disease following thrombolysis: first results. *European radiology* 19:2286-2293.

- Sugihara H, Moriyoshi K, Ishii T, Masu M, Nakanishi S (1992) Structures and properties of seven isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 185:826-832.
- Sugiura S, Yagita Y, Sasaki T, Todo K, Terasaki Y, Ohyama N, Hori M, Kitagawa K (2007) Postischemic administration of HMG CoA reductase inhibitor inhibits infarct expansion after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain research* 1181:125-129.
- Sun HS, Doucette TA, Liu Y, Fang Y, Teves L, Aarts M, Ryan CL, Bernard PB, Lau A, Forder JP, Salter MW, Wang YT, Tasker RA, Tymianski M (2008) Effectiveness of PSD95 inhibitors in permanent and transient focal ischemia in the rat. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39:2544-2553.
- 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; a journal of cerebral circulation* 46:2347-2353.
- Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Current opinion in neurobiology* 14:311-317.
- Szydlowska K, Tymianski M (2010) Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell calcium* 47:122-129.
- Takagi N, Sasakawa K, Besshoh S, Miyake-Takagi K, Takeo S (2003) Transient ischemia enhances tyrosine phosphorylation and binding of the NMDA receptor to the Src homology 2 domain of phosphatidylinositol 3-kinase in the rat hippocampus. *Journal of neurochemistry* 84:67-76.
- Tang TT, Badger JD, 2nd, Roche PA, Roche KW (2010) Novel approach to probe subunit-specific contributions to N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor trafficking reveals a dominant role for NR2B in receptor recycling. *The Journal of biological chemistry* 285:20975-20981.
- Tang Y, Xu H, Du X, Lit L, Walker W, Lu A, Ran R, Gregg JP, Reilly M, Pancioli A, Khoury JC, Sauerbeck LR, Carrozzella JA, Spilker J, Clark J, Wagner KR, Jauch EC, Chang DJ, Verro P, Broderick JP, Sharp FR (2006) Gene expression in blood changes rapidly in neutrophils and monocytes after ischemic stroke in humans: a microarray study. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1089-1102.
- 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* 30:1441-1449.
- Thomas GM, Haganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature reviews* 5:173-183.
- Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O (2006) Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem cells* 24:739-747.
- Tian J, Cheng J, Zhang J, Ye L, Zhang F, Dong Q, Wang H, Fu F (2014) Protection of pyruvate against glutamate excitotoxicity is mediated by regulating DAPK1 protein complex. *PLoS one* 9:e95777.
- Tian JH, Das S, Sheng ZH (2003) Ca²⁺-dependent phosphorylation of syntaxin-1A by the death-associated protein (DAP) kinase regulates its interaction with Munc18. *The Journal of biological chemistry* 278:26265-26274.
- Tomek SE, Lacrosse AL, Nemirovsky NE, Olive MF (2013) NMDA Receptor Modulators in the Treatment of Drug Addiction. *Pharmaceuticals* 6:251-268.

- Tovar KR, Westbrook GL (1999) The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci* 19:4180-4188.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews* 62:405-496.
- Trials C (2015) The effects of an NR2B antagonist, CP-101,106, in patients with Parkinson's disease.
- Tu W, Xu X, Peng L, Zhong X, Zhang W, Soundarapandian MM, Balel C, Wang M, Jia N, Zhang W, Lew F, Chan SL, Chen Y, Lu Y (2010) DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke. *Cell* 140:222-234.
- Valencia CA, Ju W, Liu R (2007) Matrin 3 is a Ca²⁺/calmodulin-binding protein cleaved by caspases. *Biochem Biophys Res Commun* 361:281-286.
- van der Most PJ, Dolga AM, Nijholt IM, Luiten PG, Eisel UL (2009) Statins: mechanisms of neuroprotection. *Progress in neurobiology* 88:64-75.
- Van Eldik LJ (2002) Structure and enzymology of a death-associated protein kinase. *Trends in pharmacological sciences* 23:302-304.
- Vandresen-Filho S, Martins WC, Bertoldo DB, Mancini G, Herculano BA, de Bem AF, Tasca CI (2013) Atorvastatin prevents cell damage via modulation of oxidative stress, glutamate uptake and glutamine synthetase activity in hippocampal slices subjected to oxygen/glucose deprivation. *Neurochemistry international* 62:948-955.
- Velentza AV, Schumacher AM, Watterson DM (2002) Structure, activity, regulation, and inhibitor discovery for a protein kinase associated with apoptosis and neuronal death. *Pharmacology & therapeutics* 93:217-224.
- Velentza AV, Wainwright MS, Zasadzki M, Mirzoeva S, Schumacher AM, Haiech J, Focia PJ, Egli M, Watterson DM (2003) An aminopyridazine-based inhibitor of a pro-apoptotic protein kinase attenuates hypoxia-ischemia induced acute brain injury. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 13:3465-3470.
- Vest RS, O'Leary H, Coultrap SJ, Kindy MS, Bayer KU (2010) Effective post-insult neuroprotection by a novel Ca(2+)/ calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) inhibitor. *The Journal of biological chemistry* 285:20675-20682.
- Vicini S, Wang JF, Li JH, Zhu WJ, Wang YH, Luo JH, Wolfe BB, Grayson DR (1998) Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of neurophysiology* 79:555-566.
- Vizi ES, Kisfalvi M, Lorincz T (2013) Role of nonsynaptic GluN2B-containing NMDA receptors in excitotoxicity: evidence that fluoxetine selectively inhibits these receptors and may have neuroprotective effects. *Brain research bulletin* 93:32-38.
- von Engelhardt J, Coserea I, Pawlak V, Fuchs EC, Kohr G, Seeburg PH, Monyer H (2007) Excitotoxicity in vitro by NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors. *Neuropharmacology* 53:10-17.
- Wahlgren NG, Ahmed N (2004) Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies—the need for new approaches. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 17 Suppl 1:153-166.

- Wang CX, Shuaib A (2005) NMDA/NR2B selective antagonists in the treatment of ischemic brain injury. *Current drug targets CNS and neurological disorders* 4:143-151.
- Wang CY, Liu PY, Liao JK (2008) Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends in molecular medicine* 14:37-44.
- Wang P, Guan YF, Du H, Zhai QW, Su DF, Miao CY (2012) Induction of autophagy contributes to the neuroprotection of nicotinamide phosphoribosyltransferase in cerebral ischemia. *Autophagy* 8: 77-87
- Wang LH, Kalb RG, Strittmatter SM (1999) A PDZ protein regulates the distribution of the transmembrane semaphorin, M-SemF. *The Journal of biological chemistry* 274:14137-14146.
- Wang LY, Orser BA, Brautigam DL, MacDonald JF (1994) Regulation of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons by protein phosphatases 1 and 2A. *Nature* 369:230-232.
- Wang WJ, Kuo JC, Ku W, Lee YR, Lin FC, Chang YL, Lin YM, Chen CH, Huang YP, Chiang MJ, Yeh SW, Wu PR, Shen CH, Wu CT, Chen RH (2007) The tumor suppressor DAPK is reciprocally regulated by tyrosine kinase Src and phosphatase LAR. *Mol Cell* 27:701-716.
- Wang WJ, Kuo JC, Yao CC, Chen RH (2002) DAP-kinase induces apoptosis by suppressing integrin activity and disrupting matrix survival signals. *J Cell Biol* 159:169-179.
- Wang X, Pei L, Yan H, Wang Z, Wei N, Wang S, Yang X, Tian Q, Lu Y (2014) Intervention of death-associated protein kinase 1-p53 interaction exerts the therapeutic effects against stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 45:3089-3091.
- Wang Y, Li Q, Wang J, Zhuang QK, Zhang YY (2015) Combination of thrombolytic therapy and neuroprotective therapy in acute ischemic stroke: is it important? *European review for medical and pharmacological sciences* 19:416-422.
- Warr N, Carre GA, Siggers P, Faleato JV, Brixey R, Pope M, Bogani D, Childers M, Wells S, Scudamore CL, Tedesco M, del Barco Barrantes I, Nebreda AR, Trainor PA, Greenfield A (2012) Gadd45gamma and Map3k4 interactions regulate mouse testis determination via p38 MAPK-mediated control of Sry expression. *Developmental cell* 23:1020-1031.
- Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M (1992) Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3:1138-1140.
- Watanabe M, Koike H, Ishiba T, Okada T, Seo S, Hirai K (1997) Synthesis and biological activity of methanesulfonamide pyrimidine- and N-methanesulfonyl pyrrole-substituted 3,5-dihydroxy-6-heptenoates, a novel series of HMG-CoA reductase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry* 5:437-444.
- Wechsler A, Teichberg VI (1998) Brain spectrin binding to the NMDA receptor is regulated by phosphorylation, calcium and calmodulin. *EMBO J* 17:3931-3939.
- White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS (2000) Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* 179:1-33.

- White RJ, Reynolds IJ (1996) Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *J Neurosci* 16:5688-5697.
- Widau RC, Jin Y, Dixon SA, Wadzinski BE, Gallagher PJ (2010) Protein phosphatase 2A (PP2A) holoenzymes regulate death-associated protein kinase (DAPK) in ceramide-induced anoikis. *The Journal of biological chemistry* 285:13827-13838.
- Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods* 6:359-362.
- Wong EH, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL (1986) The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(18):7104-8.
- Wong HK, Liu XB, Matos MF, Chan SF, Perez-Otano I, Boysen M, Cui J, Nakanishi N, Trimmer JS, Jones EG, Lipton SA, Sucher NJ (2002) Temporal and regional expression of NMDA receptor subunit NR3A in the mammalian brain. *The Journal of comparative neurology* 450:303-317.
- Woodruff TM, Thundyil J, Tang SC, Sobey CG, Taylor SM, Arumugam TV (2011) Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Molecular neurodegeneration* 6:11.
- World Health O (2015).
- Wu GY, Deisseroth K, Tsien RW (2001) Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:2808-2813.
- Wu HY, Hsu FC, Gleichman AJ, Bacongus I, Coulter DA, Lynch DR (2007) Fyn-mediated phosphorylation of NR2B Tyr-1336 controls calpain-mediated NR2B cleavage in neurons and heterologous systems. *The Journal of biological chemistry* 282:20075-20087.
- Wu HY, Yuen EY, Lu YF, Matsushita M, Matsui H, Yan Z, Tomizawa K (2005) Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by calpain in cortical neurons. *The Journal of biological chemistry* 280:21588-21593.
- Wu PR, Tsai PI, Chen GC, Chou HJ, Huang YP, Chen YH, Lin MY, Kimchi A, Chien CT, Chen RH (2011) DAPK activates MARK1/2 to regulate microtubule assembly, neuronal differentiation, and tau toxicity. *Cell Death Differ* 18:1507-1520.
- Wu X, Zhang H, Chen D, Song Y, Qian R, Chen C, Mao X, Chen X, Zhang W, Shao B, Shen J, Yan Y, Wu X, Liu Y (2015) Up-Regulation of CCT8 Related to Neuronal Apoptosis after Traumatic Brain Injury in Adult Rats. *Neurochemical research* 40:1882-1891.
- Wyszynski M, Lin J, Rao A, Nigh E, Beggs AH, Craig AM, Sheng M (1997) Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature* 385:439-442.
- Xing C, Arai K, Lo EH, Hommel M (2012) Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 7:378-385.
- Xiong ZG, Chu XP, Simon RP (2006) Ca²⁺-permeable acid-sensing ion channels and ischemic brain injury. *The Journal of membrane biology* 209:59-68.

- Xu J, Kurup P, Zhang Y, Goebel-Goody SM, Wu PH, Hawasli AH, Baum ML, Bibb JA, Lombroso PJ (2009) Extrasynaptic NMDA receptors couple preferentially to excitotoxicity via calpain-mediated cleavage of STEP. *J Neurosci* 29:9330-9343.
- Xu K, Zhong G, Zhuang X (2013) Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science* 339:452-456.
- Yaka R, Thornton C, Vagts AJ, Phamluong K, Bonci A, Ron D (2002) NMDA receptor function is regulated by the inhibitory scaffolding protein, RACK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:5710-5715.
- Yamamoto A, Sudo H, Endo A (1980) Therapeutic effects of ML-236B in primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 35:259-266.
- Yamamoto M, Takahashi H, Nakamura T, Hioki T, Nagayama S, Ooashi N, Sun X, Ishii T, Kudo Y, Nakajima-Iijima S, Kimchi A, Uchino S (1999) Developmental changes in distribution of death-associated protein kinase mRNAs. *J Neurosci Res* 58:674-683.
- Yamashima T (2004) Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell calcium* 36:285-293.
- Yamashita N, Takahashi A, Takao K, Yamamoto T, Kolattukudy P, Miyakawa T, Goshima Y (2013) Mice lacking collapsin response mediator protein 1 manifest hyperactivity, impaired learning and memory, and impaired prepulse inhibition. *Frontiers in behavioral neuroscience* 7:216.
- Yamazaki M, Mori H, Araki K, Mori KJ, Mishina M (1992) Cloning, expression and modulation of a mouse NMDA receptor subunit. *FEBS Lett* 300:39-45.
- Yan W, Zhang H, Bai X, Lu Y, Dong H, Xiong L (2011) Autophagy activation is involved in neuroprotection induced by hyperbaric oxygen preconditioning against focal cerebral ischemia in rats. *Brain research* 1402:109-121.
- Yano H, Ninan I, Zhang H, Milner TA, Arancio O, Chao MV (2006) BDNF-mediated neurotransmission relies upon a myosin VI motor complex. *Nature neuroscience* 9:1009-1018.
- Ye L, Huang Y, Zhao L, Li Y, Sun L, Zhou Y, Qian G, Zheng JC (2013) IL-1 β and TNF- α induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. *Journal of neurochemistry* 125:897-908.
- Yi Z, Petralia RS, Fu Z, Swanwick CC, Wang YX, Prybylowski K, Sans N, Vicini S, Wenthold RJ (2007) The role of the PDZ protein GIPC in regulating NMDA receptor trafficking. *J Neurosci* 27:11663-11675.
- Yuan A, Rao MV, Sasaki T, Chen Y, Kumar A, Veeranna, Liem RK, Eyer J, Peterson AC, Julien JP, Nixon RA (2006) Alpha-internexin is structurally and functionally associated with the neurofilament triplet proteins in the mature CNS. *J Neurosci* 26:10006-10019.
- Yuen EY, Ren Y, Yan Z (2008) Postsynaptic density-95 (PSD-95) and calcineurin control the sensitivity of N-methyl-D-aspartate receptors to calpain cleavage in cortical neurons. *Molecular pharmacology* 74:360-370.
- Zacco A, Togo J, Spence K, Ellis A, Lloyd D, Furlong S, Piser T (2003) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci* 23:11104-11111.

- Zalckvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, Sabanay H, Pinkas-Kramarski R, Kimchi A (2009) DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep* 10:285-292.
- Zhang F, Xu S, Iadecola C (1995) Time dependence of effect of nitric oxide synthase inhibition on cerebral ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:595-601.
- Zhang FX, Rubin R, Rooney TA (1998) N-Methyl-D-aspartate inhibits apoptosis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cerebellar granule neurons. A role for insulin receptor substrate-1 in the neurotrophic action of n-methyl-D-aspartate and its inhibition by ethanol. *The Journal of biological chemistry* 273:26596-26602.
- Zhang L, Nephew KP, Gallagher PJ (2007a) Regulation of death-associated protein kinase. Stabilization by HSP90 heterocomplexes. *The Journal of biological chemistry* 282:11795-11804.
- Zhang L, Zhang ZG, Ding GL, Jiang Q, Liu X, Meng H, Hozeska A, Zhang C, Li L, Morris D, Zhang RL, Lu M, Chopp M (2005) Multitargeted effects of statin-enhanced thrombolytic therapy for stroke with recombinant human tissue-type plasminogen activator in the rat. *Circulation* 112:3486-3494.
- Zhang R, Zhang C, Zhao Q, Li D (2013a) Spectrin: structure, function and disease. *Science China Life sciences* 56:1076-1085.
- Zhang S, Edelmann L, Liu J, Crandall JE, Morabito MA (2008) Cdk5 regulates the phosphorylation of tyrosine 1472 NR2B and the surface expression of NMDA receptors. *J Neurosci* 28:415-424.
- Zhang S, Taghibiglou C, Girling K, Dong Z, Lin SZ, Lee W, Shyu WC, Wang YT (2013b) Critical role of increased PTEN nuclear translocation in excitotoxic and ischemic neuronal injuries. *J Neurosci* 33:7997-8008.
- Zhang SJ, Buchthal B, Lau D, Hayer S, Dick O, Schwaninger M, Veltkamp R, Zou M, Weiss U, Bading H (2011) A signaling cascade of nuclear calcium-CREB-ATF3 activated by synaptic NMDA receptors defines a gene repression module that protects against extrasynaptic NMDA receptor-induced neuronal cell death and ischemic brain damage. *J Neurosci* 31:4978-4990.
- Zhang SJ, Steijaert MN, Lau D, Schutz G, Delucinge-Vivier C, Descombes P, Bading H (2007b) Decoding NMDA receptor signaling: identification of genomic programs specifying neuronal survival and death. *Neuron* 53:549-562.
- Zhou HH, Tang Y, Zhang XY, Luo CX, Gao LY, Wu HY, Chang L, Zhu DY (2015a) Delayed Administration of Tat-HA-NR2B9c Promotes Recovery After Stroke in Rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 46:1352-1358.
- Zhou M, Baudry M (2006) Developmental changes in NMDA neurotoxicity reflect developmental changes in subunit composition of NMDA receptors. *J Neurosci* 26:2956-2963.
- Zhou P, Qian L, D'Aurelio M, Cho S, Wang G, Manfredi G, Pickel V, Iadecola C (2012) Prohibitin reduces mitochondrial free radical production and protects brain cells from different injury modalities. *J Neurosci* 32:583-592.
- Zhou X, Chen Z, Yun W, Ren J, Li C, Wang H (2015b) Extrasynaptic NMDA Receptor in Excitotoxicity: Function Revisited. *Neuroscientist* 21:337-344.
- Zhou X, Ding Q, Chen Z, Yun H, Wang H (2013) Involvement of the GluN2A and GluN2B subunits in synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate

receptor function and neuronal excitotoxicity. *The Journal of biological chemistry* 288:24151-24159.

Zukin RS, Bennett MV (1995) Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends in neurosciences* 18:306-313.