



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Evaluación funcional del péptido EAR-20 como posible agonista de los receptores ionotrópicos de glutamato de tipo NMDA

Roberto García Díaz

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

*Programa de Doctorat en Biomedicina de la Universitat de Barcelona*

Tesis doctoral:

# **Evaluación funcional del péptido EAR-20 como posible agonista de los receptores ionotrópicos de glutamato de tipo NMDA**

Presentada por :

**Roberto García Díaz**

Grupos de Investigación:

2016-2022

Grupo de investigación en proteínas (Grip)

Departamento de Química UNAL

2018-2022

Neurofisiología

Departamento de Biomedicina UB

**Director de tesis:**

**Tutor:**

**Doctorando:**

Dr. David Soto del Cerro

Dr. Xavier Gasull Casanova

Roberto García Díaz



## *Dedicatoria*

*A mi amado Nico por entenderme y apoyarme en este largo proceso, sé que los dos hicimos un gran esfuerzo para mantenernos cerca a pesar de la distancia.*





## Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi hijo Ian Nicolas por su amor sincero e incondicional. Se que fue muy difícil comprenderme, y estar conmigo en esos momentos donde las decisiones humanas desencadenaron una explosión de sentimientos que convirtieron al mundo en un lugar gris y hostil. Fue tu virtud mantenerte a pesar de todo, no importó que muchas veces tu mente de niño estuviera desbordada a consecuencia de la incertidumbre, es completamente entendible que en ocasiones encontrar las respuestas sea una tarea tan difícil. Gracias por tu compañía a pesar de la distancia, ahora estoy totalmente convencido que las frecuencias de vibración de un amor sincero y puro son capaces de cruzar océanos.

A mis padres Roberto y Islena, y a mis hermanos John (mi sobrino Juan David), Marcela, Abaneth (mi sobrino Emanuel) y Angelica por su infinito apoyo, y ser mi soporte económico, emocional y motivacional, sin ustedes familia hubiera sido mucho más difícil avanzar y superar las diferentes situaciones que el universo y la vida me han planteado durante estos años. Por ello no es en vano decir que las cargas de la vida se llevan más fácil, cuando personas verdaderas abordan este barco llamado vida y te ayudan a dirigirlo, infinitas gracias por ser mi brújula y en ocasiones ayudarme a corregir el rumbo, ahora estoy completamente seguro de que poco a poco llegare a ese puerto con el que siempre he soñado.

Al profesor Edgar Antonio Reyes Montaña por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de investigación en Proteínas, y colaborarme con todo lo que necesite para que todos los experimentos llegaran a feliz término, gracias por sus enseñanzas, apoyo, confianza y orientación en todo este proceso doctoral.

Al profesor David Soto del Cerro primero por aceptarme en su laboratorio para realizar mi pasantía, y luego por ser mi director de tesis del Doctorado en Biomedicina de la UB. Le

## VI Evaluación funcional del péptido EAR-20 como posible agonista de los receptores ionotrópicos de glutamato tipo NMDA

---

estaré eternamente agradecido por mostrarme y enseñarme sobre este hermoso mundo llamado electrofisiología. Muchas gracias, David por tu apoyo, enseñanzas, orientación y confianza.

A la profesora Nohora Vega por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por su apoyo, orientación y confianza. Y a todos los integrantes del laboratorio de investigación en proteínas (Grip), y especialmente a los que hicieron que mi estancia allí fuera maravillosa Ariadna, Ángel, Nury Vargas, Yesica, Edwin, Zulma, Nury Carreño y Andrea Rincón, chicos fue bonito conocerlos y gracias por hacer que el trabajo de laboratorio fuera aún más interesante, fueron super divertidas todas las anécdotas que vivimos en esa época.

A todos los integrantes del laboratorio de Neurofisiología, y especialmente a Marija, Fede, Esther, Alba, Anna Pujol, Anna Pérez, Ana santos, Aida, Javier Picañol, Xavier Altafaj, Xavier Gasull, Guille, Gerard, Mar, Helena , Nuria comes, Nuria Sánchez, Sara, Irene y Mercè. Muchas gracias a todos por apoyarme y hacerme sentir parte del equipo. Debo decir que me sorprendieron gratamente los catalanes, son gente maravillosa siempre dispuestos a ayudar, super humanos, sinceros y muy orgullosos de su cultura.

Al Doctorado en Biotecnología y Biomedicina, especialmente a la Dra. Sonia Ospina Coordinadora del programa y a Raquel Noguera por ser tan eficiente y ayudarme en los diferentes procesos administrativos que fueron absolutamente desgastantes, pero gracias a ti fueron más llevaderos. A la Universidad Santiago de Cali, la convocatoria 785 de Colciencias y Predocs UB por el apoyo económico. A la Universidad Nacional de Colombia y Universidad de Barcelona por permitirme realizar mis estudios de Doctorado en sus instalaciones.

Al Dr. Pierre Paoletti de la Escuela Normal Superior de Paris y Dr. Jon W. Johnson de la Universidad de Pittsburgh por amablemente facilitarnos los plásmidos utilizados en esta investigación. Finalmente quiero agradecer a mis compañeros del Doctorado en Biotecnología, Hansen, Margareth, Diana Vinchira , Diana tuso, Julián, Jorge y Carlos, aprendí bastante cuando compartían sus proyectos en los seminarios de investigación.

## Resumen

La modulación alostérica de la función proteica supone un importante mecanismo de regulación biológica. Por lo tanto, este tipo de modulación proporciona nuevas dianas para la intervención terapéutica. Los receptores ionotrópicos para el neurotransmisor glutamato tipo N-metil-D-aspartato (NMDARs) son complejos proteicos que desempeñan un papel importante en la función neuronal, siendo claves para la correcta maduración y plasticidad de los contactos sinápticos neuronales, por lo que el control de las propiedades del receptor mediante modulación alostérica podría tener importantes repercusiones sobre los procesos de cognición y comportamiento, lo cual es de especial relevancia en procesos o patologías en las cuales existe una disfunción de los NMDARs.

Con el propósito de indagar sobre nuevas dianas de modulación alostérica de los NMDARs, en el grupo de investigación de proteínas (GRIP) de la Universidad Nacional de Colombia se diseñaron una serie de péptidos derivados de la Conantokina-G (Con-G), un documentado antagonista de los NMDARs, como estrategia para regular la actividad de los NMDARs. El objetivo de esta tesis doctoral está basado en la evaluación funcional del péptido EAR-20 (uno de los péptidos diseñados) mediante ensayos electrofisiológicos.

Inicialmente nuestros estudios mostraron que el péptido EAR-20 puede activar parcialmente los NMDARs incluso en total ausencia de los co-agonistas naturales (glutamato y glicina). De forma interesante también se ha visto que EAR-20 actúa como un modulador alostérico positivo (PAM; del inglés *positive allosteric modulator*), ya que este es capaz de potenciar la respuesta del NMDAR a sus agonistas, y disminuir la desensibilización del receptor. En relación con lo anterior, se determinó que las  $EC_{50}$  del péptido EAR-20 como PAM de las corrientes mediadas por GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B fueron  $88.74 \mu\text{M}$  y  $42.23 \mu\text{M}$  respectivamente. Además, EAR-20 produce una potenciación máxima de  $153.30 \pm 19.90 \%$  en receptores GluN1-GluN2A,  $143.75 \pm 26.80 \%$  en receptores GluN1-GluN2B y  $102.45 \pm 11.10 \%$  en receptores GluN1-GluN2D. En

## VIII Evaluación funcional del péptido EAR-20 como posible agonista de los receptores ionotrópicos de glutamato tipo NMDA

---

cambio, sobre los di-heterómeros GluN1-GluN2C la actividad PAM de EAR-20 fue de tan solo  $26.59 \pm 7.70$  %. Estos resultados muestran que EAR-20 tiene un efecto similar en los receptores di-heteroméricos ensamblados con las subunidades GluN2A, GluN2B y GluN2D, y una muy baja actividad PAM hacia los NMDARs ensamblados con la subunidad GluN2C. De igual forma cuando ensayamos la actividad PAM de EAR-20 sobre los tri-heteroméros GluN1-GluN2A-GluN2B encontramos que esta era significativamente menor, alrededor de un  $25.84 \pm 3.0$  %. En relación con esto, la actividad PAM de EAR-20 sobre los NMDARs nativos de neuronas piramidales hipocampales fue considerablemente menor a la encontrada en los di-heterómeros ensamblados con las subunidades GluN2A y GluN2B. Finalmente se estudió el efecto de EAR-20 sobre NMDARs conformados por subunidades con mutaciones que provocan una pérdida de función del receptor, encontrándose que EAR-20 es capaz de potenciar la actividad de este tipo de receptores, lo que indica que la modulación del NMDAR supondría una posible estrategia de cara a mitigar la disfunción del NMDAR.

**Palabras clave: Péptidos, Agonistas, NMDAR, *Patch-Clamp*, PAM y disfunción del NMDAR.**

## Abstract

Allosteric modulation of the protein function is an important mechanism of biological regulation. Therefore, this type of modulation provides new targets for therapeutic intervention. The ionotropic receptors for the neurotransmitter glutamate belonging to the N-methyl-D-aspartate (NMDARs) type are protein complexes that play an important role in neuronal function, being key for the correct maturation and plasticity of neuronal synaptic contacts. Thus, the control of the receptor's properties through allosteric modulation could have important repercussions on the processes of cognition and behavior, which is of special relevance in the development of pathologies associated with NMDARs-dysfunction.

With the aim to investigate new targets for allosteric modulation of NMDARs, the protein research group (GRIP) of the National University of Colombia designed a series of peptides derived from Conantokin-G (Con-G), a well-documented antagonist of NMDARs, as a strategy to regulate the NMDARs activity. The objective of this doctoral thesis is based on the functional evaluation of the peptide EAR-20 (one of the peptides designed) through electrophysiological tests.

Firstly, our studies showed that the EAR-20 peptide can partially activate NMDARs even in the total absence of natural co-agonists (glutamate and glycine). Interestingly, it has also been seen that EAR-20 acts as a positive allosteric modulator (PAM), since it is able to potentiate the response of the NMDAR to its agonists and to reduce receptor desensitization. The  $EC_{50}$  of the EAR-20 peptide as PAM of the currents mediated by GluN1-GluN2A and GluN1-GluN2B was determined to be 88.74  $\mu$ M and 42.23  $\mu$ M, respectively. Additionally, EAR-20 produces a maximal potentiation of  $153.30 \pm 19.90\%$  on GluN1-GluN2A receptors,  $143.75 \pm 26.80\%$  on GluN1-GluN2B receptors, and  $102.45 \pm 11.10\%$  on GluN1-GluN2D receptors. By contrast, on the di-heteromers GluN1-GluN2C, the PAM activity of EAR-20 was only  $26.59 \pm 7.70\%$ . These results show that EAR-20 has a similar effect on di-heteromeric receptors assembled with the GluN2A, GluN2B and GluN2D subunits, and a very low PAM activity towards NMDARs assembled with the GluN2C subunit. Similarly, when we tested the PAM activity of EAR-20 on the tri-heteromers GluN1-GluN2A-GluN2B, we found that it was significantly lower, around  $25.84 \pm 3.0\%$ . A similar low PAM activity was found for EAR-20 acting on the native NMDARs of

X Evaluación funcional del péptido EAR-20 como posible agonista de los receptores ionotrópicos de glutamato tipo NMDA

---

pyramidal hippocampal neurons, which was considerably different to the one found in the di-heteromers assembled with the GluN2A and GluN2B subunits. Finally, it was studied the effect of EAR-20 on NMDARs conformed by subunits with mutations that cause loss of function of the receptor, finding that EAR-20 can enhance the activity of this type of receptor indicating that the modulation of NMDAR might be a possible strategy to mitigate NMDAR dysfunction.

**Keywords: Peptides, NMDAR, Patch-Clamp, PAM, and dysfunction of NMDAR.**

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen .....</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>XV</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas.....</b>	<b>XIX</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>23</b>
1.1 Glutamato .....	23
1.2 Sinapsis glutamatérgica .....	24
1.3 Receptores de glutamato .....	26
1.3.1 mGluRs .....	27
1.3.2 iGluRs .....	28
1.3.2.1 AMPARs .....	29
1.3.2.2 Receptores tipo Kainato .....	30
1.4 NMDARs.....	30
1.4.1 Subunidades GluN1, GluN2 y GluN3 .....	31
1.4.2 Estructura del NMDAR .....	33
1.4.3 Mecanismo de activación e inhibición del NMDAR.....	43
1.4.4 Funciones del NMDAR.....	48
1.4.5 Farmacología del NMDAR .....	51
1.4.6 Estudio del funcionamiento de los NMDARs .....	54
1.4.6.1 <i>Pach clamp</i> .....	54
1.4.6.2 Acoplamiento molecular o docking .....	59
1.4.6.3 Dinamica molecular.....	60



XII Evaluación funcional del péptido EAR-20 como posible agonista de los receptores ionotrópicos de glutamato tipo NMDA

---

1.4.7	La disfunción del NMDAR y su posible intervención terapéutica .....	61
1.5	Péptido EAR-20.....	62
<b>2.</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>64</b>
2.1	Objetivo general .....	64
2.2	Objetivos específicos.....	64
<b>3.</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>65</b>
3.1	Síntesis, purificación y caracterización del péptido EAR-20 .....	65
3.1.1	Grupo Fmoc .....	66
3.1.2	Ciclo de acople .....	66
3.1.3	Ciclo de desprotección o desacople .....	68
3.1.4	Prueba de Ninhidrina o Test de Kaiser.....	68
3.1.5	Síntesis del péptido EAR-20 .....	69
3.1.5.1	Desanclaje del péptido EAR-20 .....	71
3.1.5.2	Caracterización del péptido EAR-20 .....	73
3.2	Registros electrofisiológicos en células HEK 293T transfectadas y neuronas hipocámpales .....	74
3.2.1	Sistema de perfusión rápida; FAST APPLICATION TOOL (FAT).....	76
3.2.2	Sistema de perfusión FAT y microinyección (IM 300 NARISHIGE) .....	77
3.2.3	Registros electrofisiológicos en neuronas hipocámpales .....	78
3.2.3.1	Extracción de hipocámpos .....	79
3.2.3.2	Disociación y cultivo de neuronas hipocámpales.....	79
3.2.3.3	Registros electrofisiológicos .....	80
3.3	Predicción in silico y validación in vitro, del posible sitio de unión del péptido EAR-20 sobre el NMDAR .....	80
3.3.1	Ensayos electrofisiológicos en NMDARs con el ATD delecionado .....	80
3.3.2	Ensayos de docking molecular entre el EAR-20 y el NMDAR .....	82
3.3.2.1	Selección de la estructura del NMDAR en “PDB” y modelamiento estructural del péptido EAR-20 .....	82
3.3.2.2	Simulación de acoplamiento molecular “Docking” .....	83
3.3.3	Validación del potencial sitio de unión de EAR-20 .....	84

3.3.3.1 Registros electrofisiológicos con EAR-20 sobre NMDARs con mutaciones puntuales .....	84
<b>4. Resultados .....</b>	<b>87</b>
4.1 Síntesis, purificación y caracterización del péptido EAR-20 .....	87
4.3.1 Determinación bioinformática de las propiedades fisicoquímicas del péptido EAR-20 .....	90
4.2 Evaluación funcional del péptido EAR-20 .....	93
4.2.1 Expresión de subunidades recombinantes del NMDAR .....	93
4.2.2 Registros electrofisiológicos en células HEK-293T mediante FAT .....	94
4.2.3 Registros electrofisiológicos en células HEK 293T mediante microinyección .....	99
4.2.4 Curva dosis respuesta de EAR-20 como agonista .....	102
4.2.5 Actividad PAM de EAR-20 .....	104
4.2.6 Curvas dosis respuesta de EAR-20 como potenciador de las corrientes mediadas por GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B .....	107
4.2.7 Actividad potenciadora de EAR-20 sobre neuronas hipocámpicas .....	110
4.2.8 Actividad potenciadora de EAR-20 sobre el tri- heterómero GluN1-GluN2A-GluN2B .....	112
4.2.9 Actividad PAM de EAR-20 sobre los di-heterómeros GluN1-GluN2C y GluN1-GluN2D .....	114
4.3 Predicción in silico y validación in vitro, del posible sitio de unión del péptido EAR-20 sobre el NMDAR .....	118
4.3.1 Ensayos electrofisiológicos sobre NMDARs con el ATD deletado ..	118
4.3.2 Ensayos de docking molecular entre el EAR-20 y el NMDAR .....	121
4.3.2.1 Modelamiento de la estructura del péptido EAR-20 .....	121
4.3.2.2 Docking molecular entre el péptido EAR-20 y el NMDAR .....	123
4.3.3 Validación del potencial sitio de unión de EAR-20 .....	125
4.3.3.3 Registros electrofisiológicos con EAR-20 sobre NMDARs con mutaciones puntuales .....	125

<b>5. Discusión .....</b>	<b>130</b>
5.1 Síntesis péptido EAR-20 .....	132
5.2 Efecto agonista del péptido EAR-20 .....	136
5.3 Efecto PAM del péptido EAR-20.....	137
5.4 Posible sitio de unión del péptido EAR-20.....	140
<b>6. Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>144</b>
6.1 Conclusiones.....	144
6.2 Recomendaciones.....	145
<b>A. Anexo: Secuencias de subunidades del NMDAR utilizadas .....</b>	<b>147</b>
<b>B. Anexo: Primers diseñados .....</b>	<b>153</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>155</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1 :</b> Proceso de síntesis de glutamato en neuronas y astrocitos.....	24
<b>Figura 1-2 :</b> Esquema general de la sinapsis glutamatérgica.....	25
<b>Figura 1-3 :</b> Clasificación de los receptores de glutamato.....	26
<b>Figura 1-4 :</b> Representación de las características estructurales de un mGluRs.....	27
<b>Figura 1-5 :</b> Estructura de un iGluR.....	28
<b>Figura 1-6 :</b> Representación esquemática de las subunidades GluN1a y GluN2B...	31
<b>Figura 1-7 :</b> Estructura del ATD de GluN2B en complejo con $Zn^{2+}$ .....	34
<b>Figura 1-8 :</b> Sitios de unión de moduladores alostéricos en GluN1-GluN2B.....	35
<b>Figura 1-9 :</b> Estructura cristalográfica de los dominios LBD de GluN1-GluN2A.....	37
<b>Figura 1-10:</b> Interfase entre GluN1-GluN2A.....	37
<b>Figura 1-11:</b> Interacción de Glu con los residuos de GluN2A.....	38
<b>Figura 1-12:</b> Estructura completa del heterotetrámero GluN1a-GluN2B.....	40
<b>Figura 1-13:</b> Sitios de mayor interacción entre los ATDs y LBDs.....	42
<b>Figura 1-14:</b> LBDs en conformación cerrada a través de puentes de disulfuro.....	44
<b>Figura 1-15:</b> Estructura de los heterodímeros ATD de GluN1b-GluN2B.....	46
<b>Figura 1-16:</b> Cambios conformacionales de los dominios extracelulares.....	47
<b>Figura 1-17:</b> Región formadora del poro S2-M3.....	48
<b>Figura 1-18:</b> Moduladores positivos alostéricos.....	53
<b>Figura 1-19:</b> Esquema general de un <i>set-up</i> para <i>Patch-Clamping</i> .....	56
<b>Figura 1-20:</b> Diferentes configuraciones de Patch Clamp.....	57
<b>Figura 1-21:</b> Esquema general para realizar un <i>docking</i> molecular.....	60
<b>Figura 3-1:</b> Aminoácido de Gly protegido en su grupo $\alpha$ -amino con el Fmoc.....	66
<b>Figura 3-2:</b> Soporte solido Resina NovaPEG Rink Amide.....	67
<b>Figura 3-3:</b> Rutas comunes para la formación del éster Bt (benzotriazolil),.....	67
<b>Figura 3-4:</b> Remoción del grupo 9-fluorenilmetoxicarbonil(Fmoc).....	68
<b>Figura 3-5:</b> Reacción general de ninhidrinas con una amina primaria.....	69
<b>Figura 3-6:</b> Síntesis del péptido EAR-20.....	71
<b>Figura 3-7:</b> Flujo para determinar coctel de desanclaje para Fmoc-SPPS.....	72
<b>Figura 3-8:</b> Procedimiento general para la transfección de células HEK-293T con las diferentes subunidades del NMDAR.....	75
<b>Figura 3-9:</b> Esquema secuencial de un registro electrofisiológico mediante la implementación del sistema de perfusión FAT.....	77

<b>Figura 3-10:</b>	Esquema general de los dos sistemas de perfusión utilizados para la evaluación funcional de EAR-20. ....	78
<b>Figura 3-11:</b>	Procedimiento general para la transfección de células HEK 293T con las subunidades del NMDAR que carecían de los ATDs.....	82
<b>Figura 4-1:</b>	Cromatograma HPLC y espectro de masas de EAR-20 crudo . ....	88
<b>Figura 4-2:</b>	Cromatograma HPLC y espectro de masas de EAR-20 puro . ....	89
<b>Figura 4-3:</b>	Modelamiento de EAR-20 por herramientas bioinformáticas . ....	92
<b>Figura 4-4:</b>	Efecto agonista del péptido EAR-20 . ....	95
<b>Figura 4-5:</b>	Efecto agonista del péptido EAR-20 + Glu . ....	97
<b>Figura 4-6:</b>	Efecto agonista del péptido EAR-20 + Gly.....	98
<b>Figura 4-7:</b>	Ejemplo del registro de corriente del NMDAR realizados para la evaluación del sistema de perfusión microinyección. ....	99
<b>Figura 4-8:</b>	Curva dosis respuesta para el Glu en di-heterómeros GluN1-GluN2A. ....	100
<b>Figura 4-9:</b>	Curva dosis respuesta para el Glu en di-heterómeros GluN1-GluN2B. ....	100
<b>Figura 4-10:</b>	Validación del microinyector para el estudio de corriente del NMDAR.. ....	101
<b>Figura 4-11:</b>	Evidencia de la actividad agonista del péptido EAR-20. ....	103
<b>Figura 4-12:</b>	Curva dosis respuesta para EAR-20. ....	103
<b>Figura 4-13:</b>	Porcentajes de respuesta de EAR-20 con respecto a la corriente evocada por la rápida aplicación mediante el FAT de los agonistas fisiológicos . ....	104
<b>Figura 4-14:</b>	Evidencia de la actividad PAM de EAR-20. ....	105
<b>Figura 4-15:</b>	Corrientes evocadas del NMDAR tras la rápida aplicación de agonistas más 500 $\mu$ M EAR-20.....	106
<b>Figura 4-16:</b>	Curva dosis respuesta del péptido EAR-20 como PAM del NMDAR ensamblado con GluN1-GluN2A. ....	107
<b>Figura 4-17:</b>	Curva dosis respuesta del péptido EAR-20 como PAM del NMDAR ensamblado con GluN1-GluN2B. ....	108
<b>Figura 4-18:</b>	Actividad PAM de EAR-20 en células HEK 293T transfectadas con los di-heterómeros GluN1-GluN2A o GluN1-GluN2B.....	109
<b>Figura 4-19:</b>	Registros electrofisiológicos en neuronas hipocámpales.....	110
<b>Figura 4-20:</b>	Actividad PAM de EAR-20 sobre células HEK 293T transfectadas con los di-heterómeros GluN1-GluN2A o GluN1-GluN2B, y sobre neuronas hipocámpales.....	111
<b>Figura 4-21:</b>	Registros electrofisiológicos de patch-clamp sobre los tri-heterómeros GluN1-GluN2A-GluN2B mediante una rápida aplicación con el FAT de agonistas o agonistas + 100 $\mu$ M de EAR-20. ....	113
<b>Figura 4-22:</b>	Actividad PAM de 100 $\mu$ M de EAR-20 sobre células HEK 293T transfectadas con los plásmidos GluN1-6A, GluN2A-r1 y GluN2B-r2, los cuales permiten la expresión exclusiva de los tri-heterómeros GluN1-GluN2A-GluN2B. ....	113
<b>Figura 4-23:</b>	Registros electrofisiológicos de patch-clamp en modalidad whole cell sobre células HEK-293T transfectadas con los di-heterómeros GluN1-GluN2A ,GluN1-GluN2B GluN1-GluN2C y GluN1-GluN2D. ....	115
<b>Figura 4-24:</b>	Actividad PAM de 100 $\mu$ M de EAR-20.....	117
<b>Figura 4-25:</b>	Validación de la expresión de los NMDARs GluN1-GluN2B <sup><math>\Delta</math>ATD</sup> . ....	119

<b>Figura 4-26:</b> Registros electrofisiológicos patch clamp con el péptido EAR-20 sobre NMDARs GluN1-GluN2A <sup>ΔATD</sup> .....	120
<b>Figura 4-27:</b> Registros electrofisiológicos patch clamp con el péptido EAR-20 sobre NMDARs GluN1-GluN2B <sup>ΔATD</sup> .....	120
<b>Figura 4-28:</b> Actividad PAM de 100 μM de EAR-20 sobre receptores GluN1-GluN2A <sup>ΔATD</sup> y GluN1-GluN2B <sup>ΔATD</sup> .....	121
<b>Figura 4-29:</b> Modelos predichos para la estructura del péptido EAR-20.....	122
<b>Figura 4-30:</b> Resultados del <i>docking</i> ciego. ....	124
<b>Figura 4-31:</b> Residuos importantes para la unión del péptido EAR-20.. ....	125
<b>Figura 4-32:</b> Ensayos electrofisiológicos realizados con 100 μM de EAR-20 sobre HEK-293T transfectadas con subunidades mutadas que producen hipofunción del di-heterómero GluN1-GluN2A . ....	126
<b>Figura 4-33:</b> Ensayos electrofisiológicos realizados con 100 μM de EAR-20 sobre HEK-293T transfectadas con subunidades mutadas que producen hipofunción del di-heterómero GluN1-GluN2B . ....	127
<b>Figura 4-34:</b> Ensayos electrofisiológicos realizados con 100 μM de EAR-20 sobre HEK-293T transfectadas con las subunidades GluN1 que presenta la mutación encontrada mediante los estudios de <i>docking</i> .....	128
<b>Figura 4-35:</b> Registros electrofisiológicos con EAR-20 sobre NMDARs con mutaciones encontradas en pacientes con GRINpatias que causan hipofunción del receptor .....	129
<b>Figura 5-1:</b> Formación de aspartimida . ....	133

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 4-1:</b> Resultados de la síntesis del péptido EAR-20.....	90
<b>Tabla 4-2:</b> Propiedades fisicoquímicas EAR-20.....	91
<b>Tabla 4-3:</b> Evaluación de diferentes parámetros de transfección para NMDARs en células HEK 293T. ....	93
<b>Tabla 4-4:</b> Cavidades o regiones del NMDAR con mayor afinidad hacia EAR-20. ....	123
<b>Tabla 5-1:</b> Secuencias Asp-Xaa sensibles a formar aspartimididas.....	134

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolenpropiónico
Glu	Glutamato
iGluRs	Receptores ionotrópicos de glutamato
mGluRs	Receptores metabotrópicos de glutamato
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor N-metil-D-aspartato
NMDARs	Receptores N-metil-D-aspartato
Gly	Glicina
Con-G	Conantokina G
EAR- 20	Péptido EAR- 20
EAR -18	Péptido EAR -18
EAR -16	Péptido EAR -16
PCP	Fenciclidina
IUPHAR	International Union of Basic and Clinical Pharmacology
HUGO	Human Genome Organization
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CT	Carboxi-terminal
NT	Amino-terminal
GRIP	Grupo de investigación en proteínas



XX Evaluación funcional del péptido EAR-20 como posible agonista de los receptores ionotrópicos de glutamato tipo NMDA

---

GluN1	Subunidad GluN1 del NMDAR
GluN2	Subunidad GluN2 del NMDAR
GluN3	Subunidad GluN3 del NMDAR
ATD	Dominio amino terminal
LBD	Dominio de unión a ligando
TMD	Dominio de transmembrana
CTD	Dominio carboxil-terminal
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
TBTU	Tetrafluoroborato de N, N, N', N'-tetrametil-O-(benzotriazol-1-il) uronio
DIEA	N, N-diisopropiletilamina
IPA	Isopropanol
DCM	Diclorometano
DMF	Dimetilformamida
TFA	Ácido trifluoroacético
EDT	Etanoditiol
TIS	Triisopropilsilano
RP18e	Columna en fase reversa de longitud 18 carbonos chromolith
MALDI-TOF	Espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistido por matriz y analizador de tiempo de vuelo
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HCCA	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinnamico
ACN	Acetonitrilo
m/z	Relación masa/carga

DPBS	Solución tamponadora de fosfatos Dulbecco (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)
PNGM	Medio neurobasal primario
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
$\gamma$	Gamma
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle's médium</i>
HEK 293T	Células embrionarias de riñón humano
SNC	Sistema Nervioso Central
PAM	Modulador alostérico positivo
NAM	Modulador alostérico negativo
KDa	Kilodaltons
Wt	Wild type
A $\beta$	Péptido Beta amiloide
BBB	Barrera hematoencefálica
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> / calmodulina proteína cinasa II
DIV	<i>Dia in vitro</i>
EAAT	Transportadores de aminoácidos excitatorios
EC <sub>50</sub>	Concentración efectiva 50
ER	Retículo endoplasmático
FBS	Suero fetal bobino
GABA	Ácido $\gamma$ - aminobutírico
Gln	Glutamina
Glut1	Transportador de glutamato 1
GOF	Ganancia de función
LOF	Perdida de función
GLYT1	Transportadores de glutamato tipo 1

XXII Evaluación funcional del péptido EAR-20 como posible agonista de los receptores ionotrópicos de glutamato tipo NMDA

---

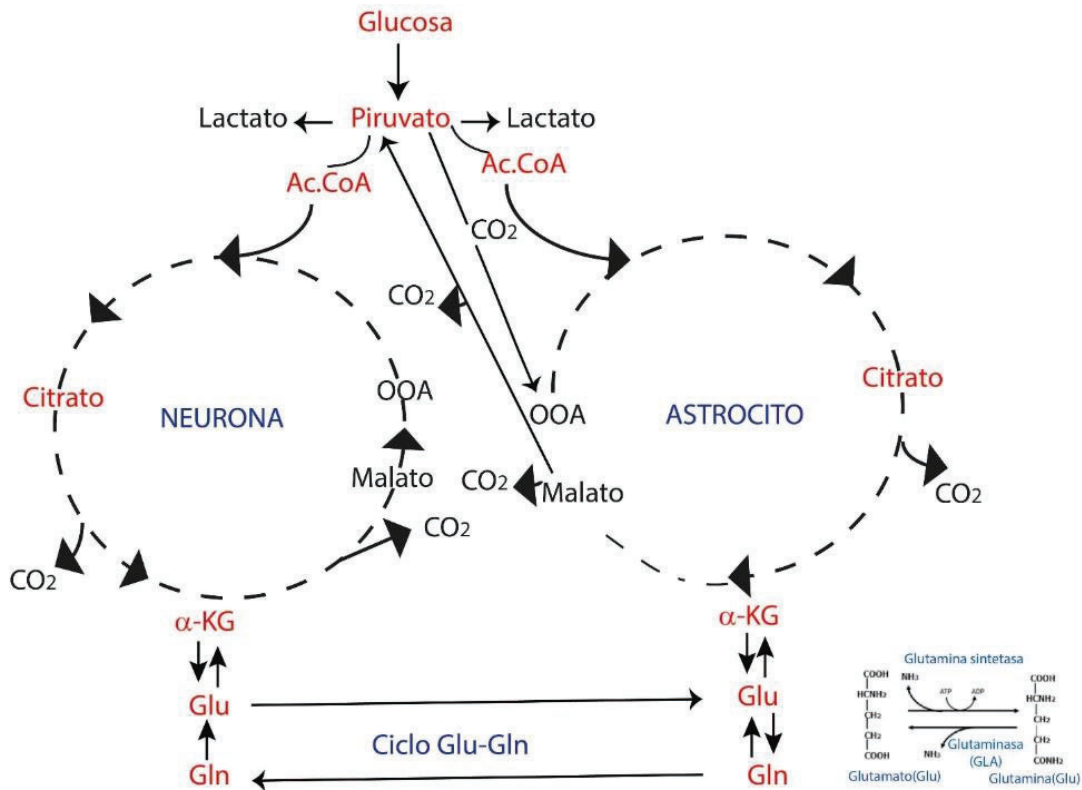
HEK 293T	Células embrionarias de riñón humano
ID	Discapacidad intelectual
LTD	Depresión a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
KO	Knock- out
KA	Ácido kaínico
KAR	Receptor de Kainato
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PEI	Polietilenimina
PD	Enfermedad de Parkinson
PSD	Densidad postsináptica
PKA	Proteína cinasa A
RT	Temperatura ambiente
RPM	Rotaciones por minuto
TTX	Tetrodotoxina
TCA	Ciclo del ácido tricarbóxico
VGLUT	Transportadores de glutamato vesicular

# 1. Introducción

## 1.1 Glutamato (Glu)

De la gran variedad de neurotransmisores que participan en los procesos de comunicación de nuestro organismo, el Glu es el más abundante del SNC. Éste, es un aminoácido no esencial que no atraviesa la barrera hematoencefálica, y, por lo tanto, ha de ser sintetizado por las neuronas y astrocitos a partir de glucosa. Este proceso comienza con la conversión de glucosa en acetil coenzima A (AC-CoA) mediante la glicolisis; la AC-CoA ingresa en el ciclo de Krebs y se transforma en alfa-cetoglutarato ( $\alpha$ -KG), el cual finalmente se convierte en Glu mediante una reacción de transaminación catalizada por una aminotransferasa (figura 1-1) (Hubbard and Binder, 2016).

Además del proceso bioquímico descrito anteriormente, las neuronas también pueden obtener Glu a partir de glutamina (Gln) producida o reciclada por los astrocitos, esta reacción de hidrolisis del grupo amino de la Gln es mediada por glutaminasa (GLA), y se conoce con el nombre de ciclo glutamina-glutamato (figura 1-1) (Watford, 2015). Finalmente, el Glu es almacenado en vesículas presinápticas en altas concentraciones (aproximadamente 200 mM) por transportadores de glutamato vesiculares (VGLUT<sub>s</sub>) mediante un proceso dependiente de Cl<sup>-</sup> / ATP (Maus and Peters, 2017; Eriksen et al. 2016).



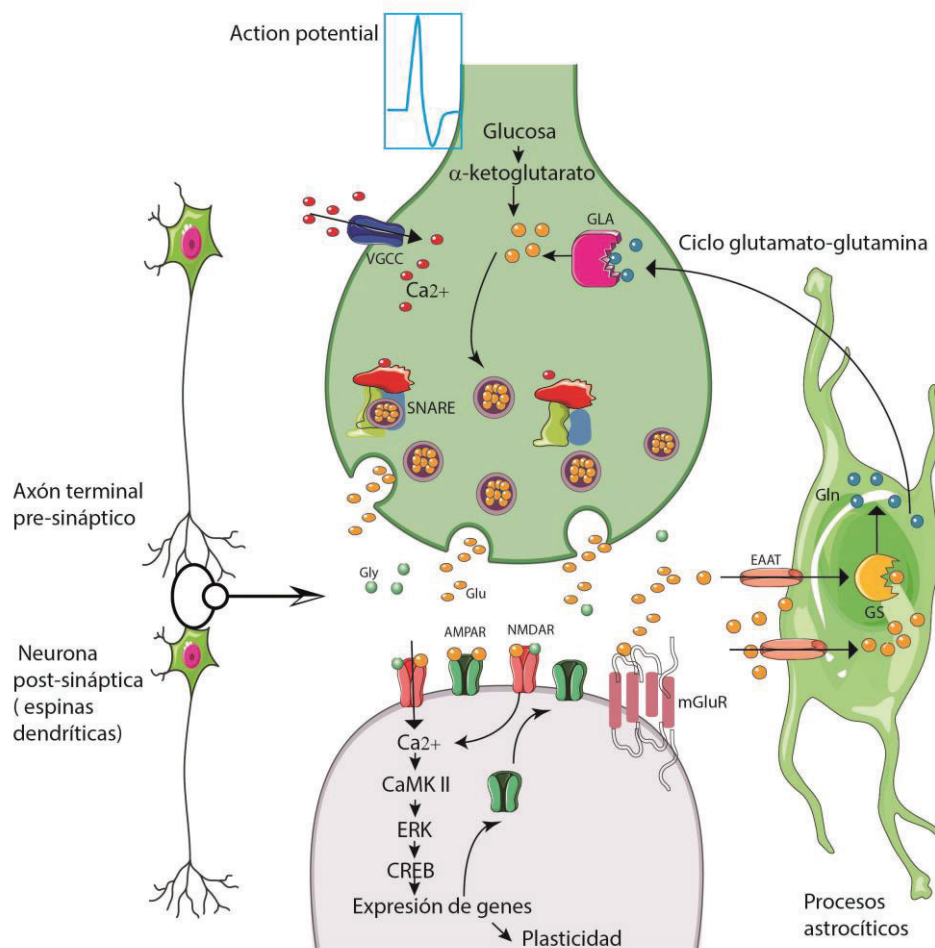
**Figura 1-1:** Proceso de síntesis de glutamato en neuronas y astrocitos. Adaptado Leif Hertz 2013 (Hertz, 2013).

## 1.2 Sinapsis glutamatérgica

La sinapsis es el lugar físico donde se llevan a cabo la comunicación entre neuronas. Este proceso se inicia debido a un estímulo transmitido a lo largo del axón neuronal (potencial de acción) de una neurona presináptica que altera la permeabilidad de la membrana al catión sodio ( $\text{Na}^{+1}$ ) como consecuencia de la apertura de los canales de sodio dependientemente de voltaje ( $\text{VGSC}_s$ ). Esta entrada de  $\text{Na}^{+1}$  produce finalmente una despolarización del terminal de esta neurona presináptica que desencadena la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje ( $\text{VGCC}_s$ ), incrementándose de esta manera la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  (Hammond, 2015). Este incremento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  activa el complejo de proteínas conocido como SNARE que permite la fusión, y la posterior liberación de las vesículas que contienen Glu a la hendidura sináptica (Popoli *et al.*, 2012). Una vez liberado el Glu, éste activa los iGluRs y mGluRs, que

desencadenan la neurotransmisión glutamatergica rápida, y distintos efectos neuromoduladores a largo plazo respectivamente (Figura1-2) (Banerjee *et al.*, 2016).

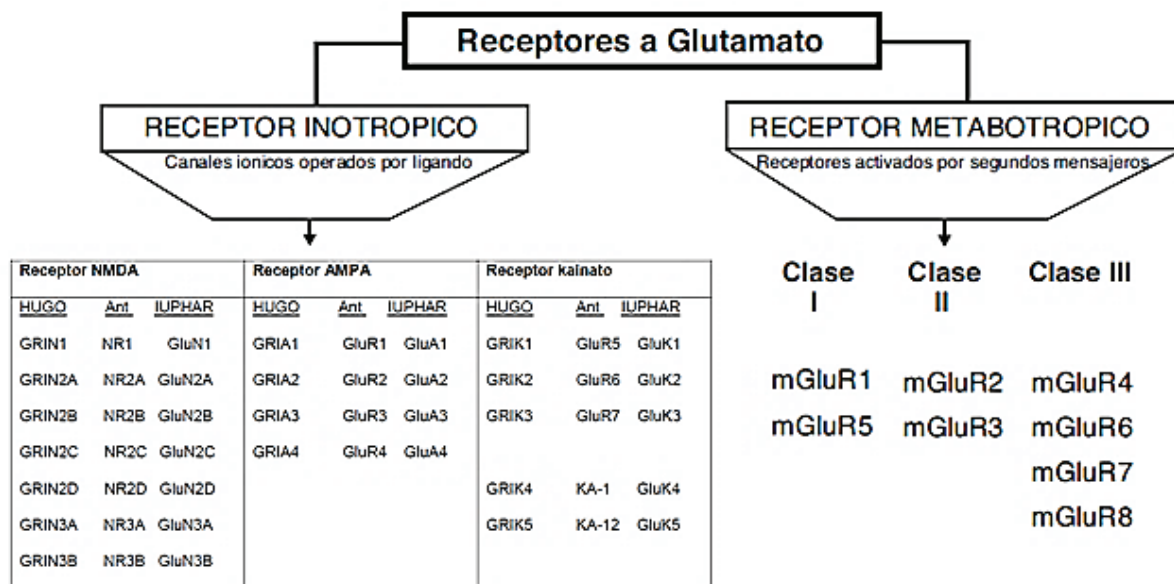
El Glu que se ha liberado es reciclado rápidamente mediante transportadores específicos dependientes de sodio conocidos como EAAT (*Excitatory Amino Acid transporters*), que controlan su concentración extracelular dentro de límites no tóxicos (0,1-0,6  $\mu\text{M}$ ). Son tan importantes estos procesos, que las neuronas destinan la mayor parte de su gasto energético manteniendo el potencial de membrana y conservando bajas las concentraciones extracelulares de Glu (Ortega 2017).



**Figura 1-2:** Esquema general de una sinapsis glutamatergica. La llegada de un potencial de acción al botón pre-sináptico desencadena la liberación pre-sináptica de Glu. El Glu liberado se une y activa los iGluRs (AMPA, NMDAR) y mGluRs. Finalmente, los transportadores de glutamato (EAAT) presentes en los astrocitos regulan los niveles de glutamato.

### 1.3 Receptores de Glutamato

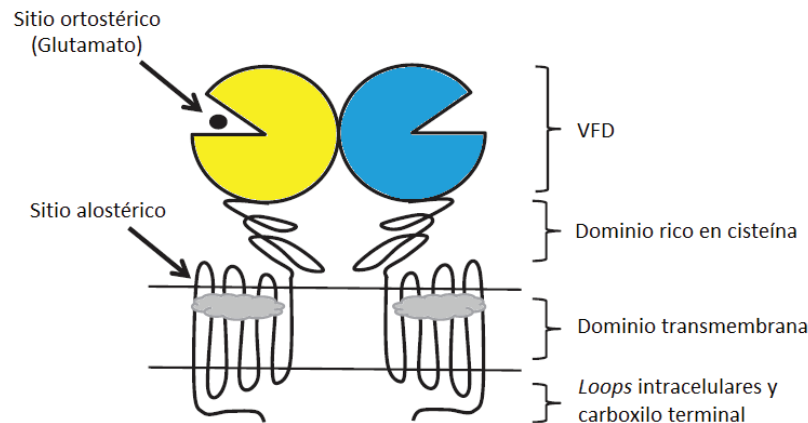
El Glu ejerce su función gracias a dos tipos de receptores, los iGluRs y mGluRs. Desde 1989 cuando se clonó la primera subunidad de los receptores de Glu (Hollmann *et al.*, 1989), diferentes subunidades de estos receptores pertenecientes a varias especies fueron clonadas en muy poco tiempo (Hollmann, 1994). Esto hizo que se creara una gran confusión entre los diferentes laboratorios e investigadores, ya se le otorgaban diferentes nombres a una misma proteína. Este problema se logró resolver gracias a la aparición de una nueva nomenclatura para los receptores de Glu por parte de la IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology) y HUGO (Human Genome Organization) de forma que hubiera homogeneidad en la clasificación de los GluRs (figura 1-3) (Collingridge *et al.*, 2009).



**Figura 1-3:** Clasificación de los receptores de glutamato. Nomenclatura para las diferentes subunidades de los receptores ionotrópicos de glutamato. HUGO (nombre del gen), Ant (Nomenclatura anterior o antigua para la proteína), IUPHAR (nueva nomenclatura para la proteína). Adaptado Traynelis *et al.* 2010 (Traynelis *et al.*, 2010).

### 1.3.1 mGluRs

Los mGluRs pertenecen al grupo de receptores transmembranales que atraviesan siete veces la membrana plasmática de la célula (C7TMR), subfamilia a la que también pertenecen diversos tipos de receptores como los sensores de calcio (CASRs), el receptor para el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABAR), o receptores de feromonas y de sabores entre otros. Todos ellos tienen como estructura general una única subunidad proteica que se caracteriza por su gran dominio extracelular amino terminal, además de sus 7 dominios transmembranales  $\alpha$ -helicoidales que atraviesan siete veces la membrana, siendo esta última la principal característica de estos receptores. Los mGluRs son funcionales cuando forman dímeros, ya sea como homo o heterodímeros (figura 1-4). Estos receptores se acoplan a proteínas G, y transducen la señal de unión del agonista al interior de la célula a través de una cascada de señalización mediada por segundos mensajeros intracelulares. Hasta la fecha se han clonado 8 subunidades diferentes que han sido denominadas como mGluR1 hasta la mGluR8, agrupándose de acuerdo con: a) la homología de sus aminoácidos (70% de homología entre los miembros de una misma clase y 45% de homología entre cada clase), b) en la respuesta a diferentes compuestos sintéticos, y c) a la vía de señalización de segundos mensajeros que activan (Gregory, Noetzel and Niswender, 2013).



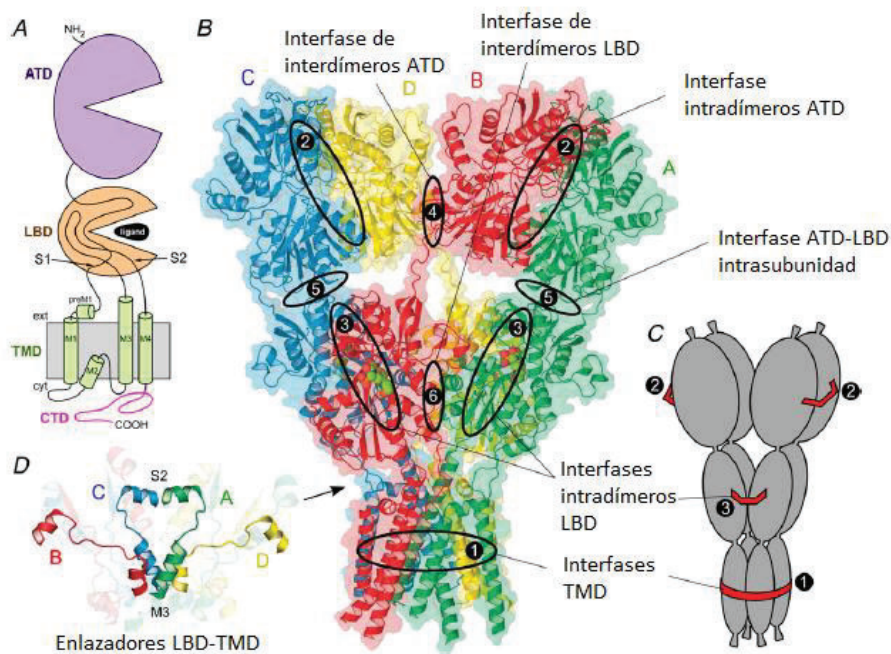
**Figura 1-4:** Representación de las características estructurales de un mGluRs. El gran dominio N-terminal, comúnmente se conoce con el nombre de dominio venus atrapamoscas (VFD, del inglés *Venus-Fly trap domain*). Este presenta sitios de unión para ligandos endógenos. Tomado y modificado de Gregory *et al.* 2013 (Gregory, Noetzel and Niswender, 2013).



### 1.3.2 iGluRs

Los iGluRs son proteínas integrales de membrana compuestas por cuatro subunidades de más de 850 residuos cada una que se asocian para ensamblar el receptor que es operado por la unión de Glu, y cuya asociación forma en el centro del receptor un poro iónico. La topología general de una subunidad iGluR consiste en un dominio amino terminal (ATD), un dominio de unión al ligando (LBD) constituido por dos segmentos de aminoácidos denotados como S1 y S2, tres dominios transmembranales (TMD; M1, M3, M4), un *loop* o segmento reentrante de poro (M2) y un dominio carboxilo terminal (CTD) (Figura 1-5A) (Traynelis *et al.*, 2010; Twomey and Sobolevsky, 2018).

Los iGluRs se clasifican en tres subfamilias, de acuerdo a su afinidad selectiva hacia agonistas sintéticos, como el ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolenpropiónico (receptores AMPA), kainato (receptores de kainato), y N-metil-D-aspartato (receptores NMDA) (Mayer, 2006; Hansen *et al.* 2021).



**Figura 1-5:** Estructura de un iGluR. **A**, Topología de una subunidad iGluR. **B**, Estructura del receptor AMPA (GluA2) código PDB 3GK2, las cuatro subunidades se muestran coloreadas diferencialmente. **C**, modelo de salchichas que muestra la unión de las cuatro subunidades mediante tres interacciones fuertes. **D**, sitios de unión entre el dominio LBD-TMD. Tomado y modificado de Sobolevsky *et al.* 2015 (Sobolevsky *et al.* 2015).

La primera estructura cristalográfica con alta resolución (3.6 Å) que se reportó de un iGluR, fue para el tetrámero de subunidades GluA2 (figura 1-5). Con esta estructura se logró identificar que el AMPAR tiene forma de la letra “Y” mayúscula con sus diferentes dominios organizados en niveles; los dominios ATD se localizan en la parte superior, los dominios LBD en el medio y los dominios TMD en la parte inferior que está situada de manera intracelular. Los cuatro dominios TMD de las cuatro subunidades se ensamblan para formar un único canal iónico, lo que sugiere que los TMD contribuyen de manera importante a la estabilidad del tetrámero. Apoyando esta afirmación, se encuentra el hecho de que mutaciones en la interfase de los dominios TMD interfieren con la propiedad de oligomerización de las subunidades iGluR, o producen cambios drásticos en las características funcionales de estos canales, como por ejemplo en la conductancia del canal, modulación alostérica, permeabilidad al  $\text{Ca}^{+2}$  y en el bloqueo iónico del canal (Sobolevsky *et al.* 2015).

### 1.3.2.1 AMPARs

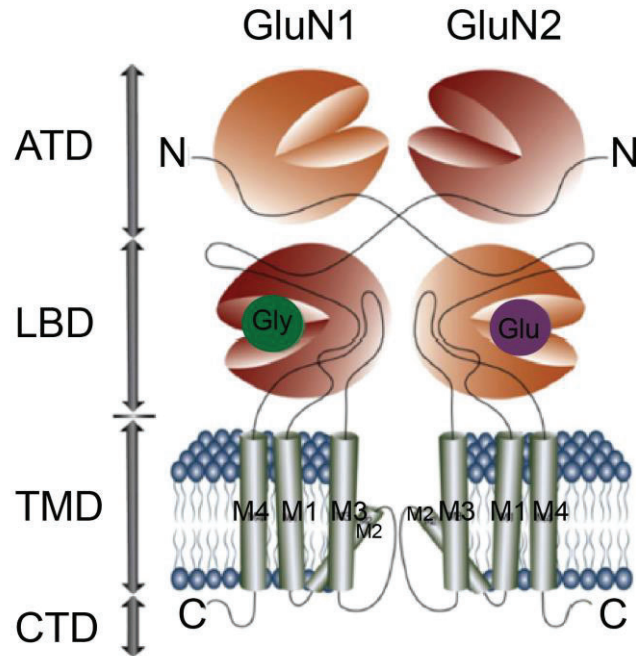
Los AMPARs median el componente excitatorio rápido de la neurotransmisión glutamatergica. Estos receptores se forman por combinaciones de las subunidades GluA 1-4, que forman un canal iónico permeable a  $\text{Na}^{+1}$  y  $\text{K}^{+1}$  y normalmente impermeables a  $\text{Ca}^{+2}$ . Sin embargo, aquellos AMPARs que no incluyen la subunidad GluA2 en su estructura son altamente permeables a  $\text{Ca}^{+2}$ . Lo anterior, es debido a la presencia de un residuo de arginina (R) en la posición R586 de la subunidad GluA2 en el TMDII, a diferencia de las subunidades GluA1, GluA3 y GluA4 que presentan un residuo de glutamina (Q) en la posición Q582; el mayor tamaño del residuo R junto con la carga positiva es el determinante de la impermeabilidad al  $\text{Ca}^{+2}$  en los AMPARs que contienen esta subunidad GluA2. El número de AMPARs permeables a calcio está regulado en respuesta a la actividad sináptica fisiológica y a ciertos estados patológicos (Rogawski, 2015; Twomey and Sobolevsky, 2018).

### 1.3.2.2 Receptores tipo Kainato (KARs)

Los KARs median la despolarización postsináptica y se ha descrito que estos son responsables de contribuir en parte a la corriente postsináptica en algunos tipos de sinapsis. Además, los KARs han sido relacionados con la modulación presináptica de la liberación sináptica de GABA y glutamato en diferentes sitios del SNC (Min, Melyan and Kullmann, 1999). También se ha reportado que los KARs juegan un papel importante sobre la maduración de los circuitos neuronales durante el desarrollo. Estos receptores están conformados por las subunidades GluK1, GluK2, GluK3, GluK4 y GluK5 (anteriormente conocidas como GluR5–GluR7 y KA1 y KA2 respectivamente). De éstas, las combinaciones de subunidades GluK1-GluK3 pueden conformar receptores homodiméricos y heterodiméricos funcionales. Mientras GluK4 y GluK5 sólo pueden estar presentes en receptores funcionales cuando se oligomerizan con alguna de las subunidades GluK1-GluK3. Al igual que los AMPARs, éstos pueden ser activados solamente por el Glu (Lerma and Marques, 2013).

## 1.4 NMDARs

Los (NMDARs) funcionan obligatoriamente como ensamblajes tetraheteroméricos, que normalmente están formados por dos subunidades de unión a glicina (GluN1) y dos subunidades GluN2 que unen glutamato (GluN2A, GluN2B, GluN2C o GluN2D), o una combinación de dos de éstas últimas. Cuando las dos subunidades GluN2 que conforman el tetrámero son iguales se obtienen NMDARs di-heteroméricos, y cuando éstas son diferentes se producen receptores tri-heteroméricos. Cada subunidad del NMDAR está compuesta por cuatro dominios (ATD, LBD, TMD y CTD) con diferentes roles funcionales (figura 1-6) (Karakas and Furukawa, 2014).



**Figura 1-6:** Representación esquemática de dos tipos de subunidades GluN. Las subunidades GluN comparten una estructura similar, todas están compuesta por 4 diferentes dominios (ATD, LBD, TMD y CTD). En color verde se muestra el sitio de unión de Gly en el dominio LBD de la subunidad GluN1, y de color violeta se muestra el sitio de unión de Glu en el dominio LBD de la subunidad GluN2. Tomado y modificado de Kane y Costa, 2015 (Kane and Costa, 2015).

Como se ha mencionado anteriormente, los NMDARs requieren para su activación la unión del co-agonista (glicina o D-serina), la unión del agonista L-glutamato y el desbloqueo del canal del catión  $Mg^{2+}$ . Además, los diferentes tipos de NMDARs que se forman como resultado de las diferentes combinaciones de subunidades GluN, muestran diferentes propiedades biofísicas (Bouvier *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2020).

### 1.4.1 Subunidades GluN1, GluN2 y GluN3

Los NMDARs en el SNC están constituidos por distintos tipos de subunidades que provienen de 7 genes diferentes y que se clasifican, desde el punto de vista de su origen genético y función, en tres grupos: subunidades de tipo 1 (GluN1) para las formas aisladas de rata con una secuencia de 867 a 941 aminoácidos, subunidades tipo 2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C y GluN2D) para las formas aisladas de rata con una secuencia 1218-1482 aminoácidos, y subunidades de tipo 3 (GluN3A y GluN3B) para las formas aisladas

de rata con una secuencia de 1082-1089 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de las distintas subunidades del NMDAR tienen un alto grado de conservación, siendo la identidad de aproximadamente un 20% entre las formas GluN1, GluN2 y GluN3, y de un 50% al comparar las distintas subunidades GluN2 o GluN3 entre sí (Mori and Mishina, 1995 ; Traynelis *et al.*, 2010).

La subunidad GluN1 está codificada por un solo gen, sin embargo, existen variantes en la lectura del ARNm, debido a que éste sufre un corte y empalme que genera al menos ocho isoformas (Lichnerova *et al.*, 2015). El corte y empalme del ARNm de las subunidades GluN2 produce dos variantes para GluN2B, pero no hay otras formas isoformas conocidas para GluN2A, GluN2C o GluN2D (Tabish and Ticku, 2004). Por tanto, las diferencias funcionales del NMDAR atribuibles a las subunidades GluN2 derivan fundamentalmente del uso alternativo de los distintos genes (Wyllie, Livesey and Hardingham, 2013; Paoletti, Bellone and Zhou, 2013).

Todas las subunidades GluN2 presentan un gran dominio intracelular C-terminal mucho más extenso que el de las subunidades GluN1. Las subunidades GluN2 además tienen en su secuencia C-terminal dominios de interacción con proteínas que contienen dominios PDZ, que no solo facilitan la localización de los NMDARs en la superficie celular, sino que, al igual que sucede con GluN1, pueden contribuir a su estabilidad al enmascarar los dominios de internalización (Paoletti, Bellone and Zhou, 2013).

La expresión de las subunidades GluN2 está regulada diferencialmente en las diferentes regiones del cerebro. En roedores, por ejemplo, las subunidades GluN2B y GluN2D se expresan de manera abundante en el periodo embrionario, pero, aunque la expresión de GluN2B permanece elevada en la fase adulta, esta está restringida al prosencéfalo (cerebro anterior). Por el contrario, la expresión de GluN2D disminuye en animales adultos, localizándose principalmente en las estructuras del cerebro medio, incluyendo el diencefalo y el mesencefalo. En cuanto a la expresión de GluN2A, ésta comienza tras el nacimiento, y aumenta progresivamente hasta convertirse en la subunidad más abundante en todo el sistema nervioso central. Por lo tanto, en las estructuras cerebrales superiores como la corteza y el hipocampo, los NMDARs cambian la proporción de subunidades GluN2B a GluN2A durante el desarrollo. Finalmente, la expresión de GluN2C comienza en

la segunda semana posnatal, pero está limitada al cerebelo y al bulbo olfatorio (Vieira *et al.*, 2020).

Además, la localización de las diferentes subunidades GluN2 de los NMDARs también varían a nivel subcelular. En el cerebro anterior del adulto, los receptores que contienen GluN2A se localizan predominantemente en los contactos sinápticos, mientras que los di-heterómeros ensamblados con GluN2B se localizan principalmente de manera extrasináptica. Sin embargo, otras subunidades GluN2 diferentes de GluN2A también pueden contribuir a las corrientes sinápticas mediadas por los NMDARs en otras regiones del cerebro, como en la amígdala y el cuerpo estriado (Wyllie, Livesey and Hardingham, 2013 ; Vieira *et al.*, 2020 ).

Las subunidades GluN2A y GluN2B han sido consideradas como las más abundantes en las neuronas del SNC, siendo el complejo tri-heteromérico (GluN1- GluN2A- GluN2B) el NMDAR predominante en las sinapsis hipocámpales. En este sentido se ha encontrado que la cinética de desactivación de este tri-heterómero es distinta a los di-heterómeros GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B, lo que sugiere que las subunidades GluN2 controlan una amplia gama de propiedades funcionales de los NMDARs, y pueden sufrir variaciones estructurales durante las modulaciones alostéricas (Hansen *et al.*, 2014 ; Lü *et al.*, 2017).

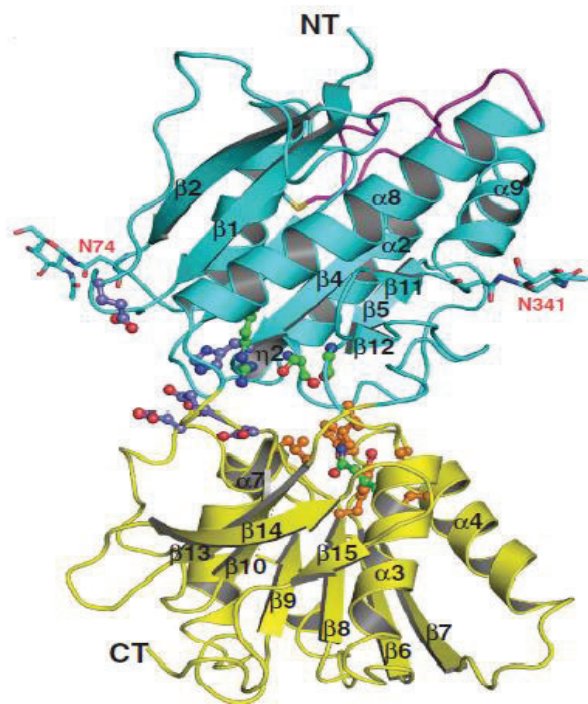
Las subunidades GluN3 son poco frecuentes y raramente encontradas como componente estructural de los NMDARs, y existen evidencias que sugieren que cuando forman parte de los NMDARs, probablemente actúan como dominantes negativas de la actividad del receptor (Mesic *et al.*, 2016). Estas subunidades unen glicina, pero su perfil farmacológico es sustancialmente diferente al de las subunidades GluN1 y actualmente no hay agentes farmacológicos selectivos para esta subunidad (Madry *et al.*, 2007). En general se tiene muy poco conocimiento sobre la función y el rol que juega en el SNC.

## 1.4.2 Estructura del NMDAR

Los dominios mencionados anteriormente (ATD, LBD, TMD y CTD) de cada una de las subunidades del NMDAR son responsables del control de distintas funciones. El ATD facilita el ensamblaje entre las subunidades, y está relacionado con la modulación de la función del receptor (inhibición o potenciación de la actividad del canal iónico) debido a que ATD presenta sitios específicos para la unión de: moduladores alostéricos negativos



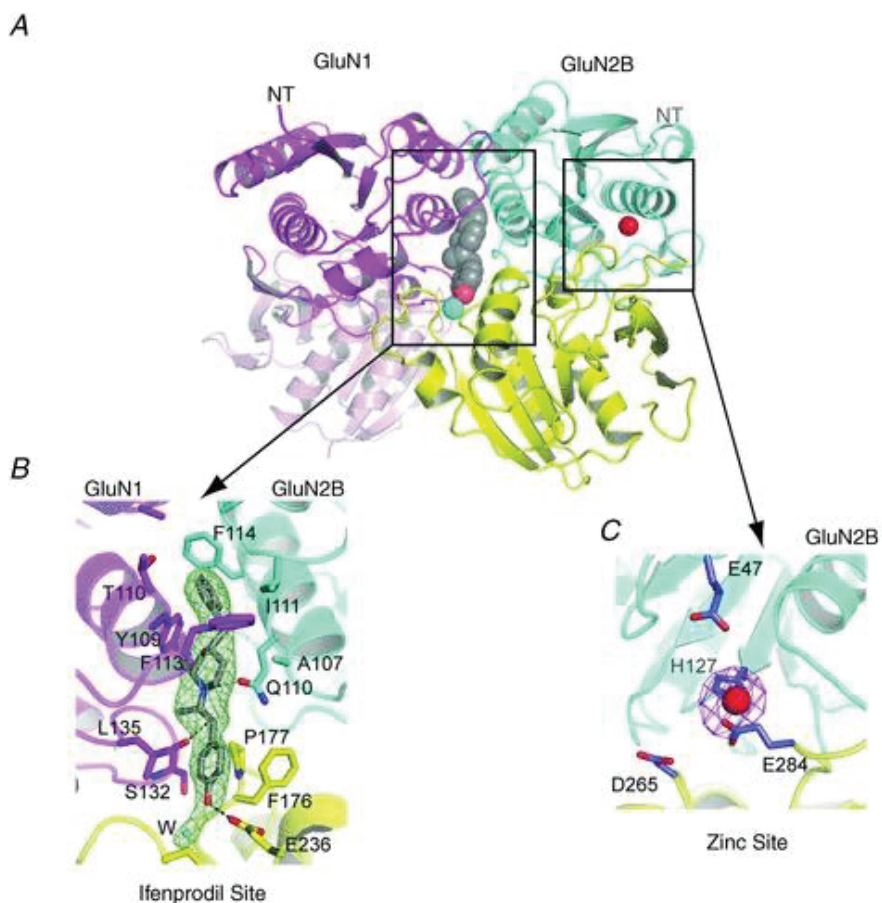
(NAMs) como el Zinc (GluN2A y 2B), ifenprodil (GluN2B) y Ro 25-6981 (GluN2B), y positivos (PAMs) como PYD-106 (GluN2C), poliaminas (GluN2B) y sulfato de pregnenolona entre otros (Furukawa, 2012; Romero-Hernandez *et al.*, 2016; Kysilov *et al.*, 2022). Antes del año 2014 no se conocía la estructura completa del heterotetrámero del receptor de NMDA, y, por lo tanto, el conocimiento de los NMDARs se basaba en la información estructural de los dominios extracelulares ATD (Figura 1-7) y LBD (figura 1-9).



**Figura 1-7:** Representación en forma de cintas de la estructura cristalográfica (2.80Å de resolución) del ATD de GluN2B en complejo con Zn<sup>2+</sup> (Código PDB 3JPW). La arquitectura del dominio ATD de la subunidad GluN2B es bilobulada, y sus dominios R1 (Azul) y R2 (Amarillo), forman una estructura muy parecida a la de una concha bilobulada. En esta figura se puede observar un *loop* hipervariable (HVL en morado) que está orientado por un enlace disulfuro de manera que cubre la parte superior del R1. Los residuos involucrados en la unión del Zn<sup>2+</sup>, feniletanolamina e iones son representados por estructuras de esferas de color azul, naranja y verde respectivamente. Tomado de Karakas *et al.* 2009 (Karakas, Simorowski and Furukawa, 2009).

En 2009 Karakas *et al* lograron cristalizar el ATD de la subunidad GluN2B en complejo con Zn<sup>2+</sup> y feniletanolamina (figura 1-7), gracias a esta información estructural, se logró identificar que la hendidura del dominio ATD de la subunidad GluN2B puede estar dividida

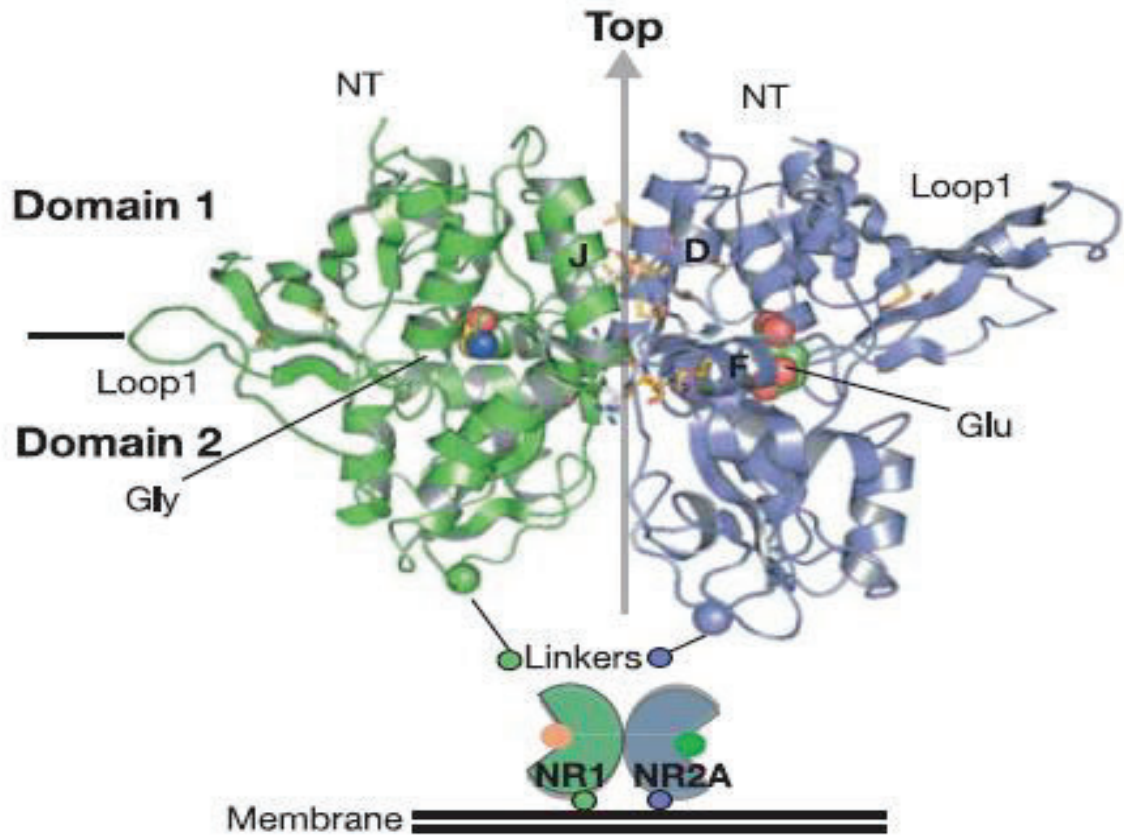
en tres diferentes regiones con respecto a sus propiedades químicas y roles funcionales (Karakas, Simorowski and Furukawa, 2009). La primera región presenta un bolsillo hidrofílico conformado por residuos polares dentro de los que sobresalen la H127 y E284, los cuales han sido descritos como claves para la unión al  $Zn^{+2}$  (figura 1-8C). La Segunda región es un bolsillo hidrofóbico ubicado en el interior del centro de la estructura bilobulada, que contiene los residuos I111, S132, F176, Y231, F114 y F113, los cuales han sido considerados como importantes para la unión de ifenprodil (figura 1-8B). Y finalmente la tercera región localizada entre los bolsillos hidrofílico e hidrofóbico, la cual está representada por los residuos S131, F146 y Q153, que permite la unión de iones  $Cl^-$  y  $Na^{+1}$  (Figura 1-7) (Furukawa, 2012).



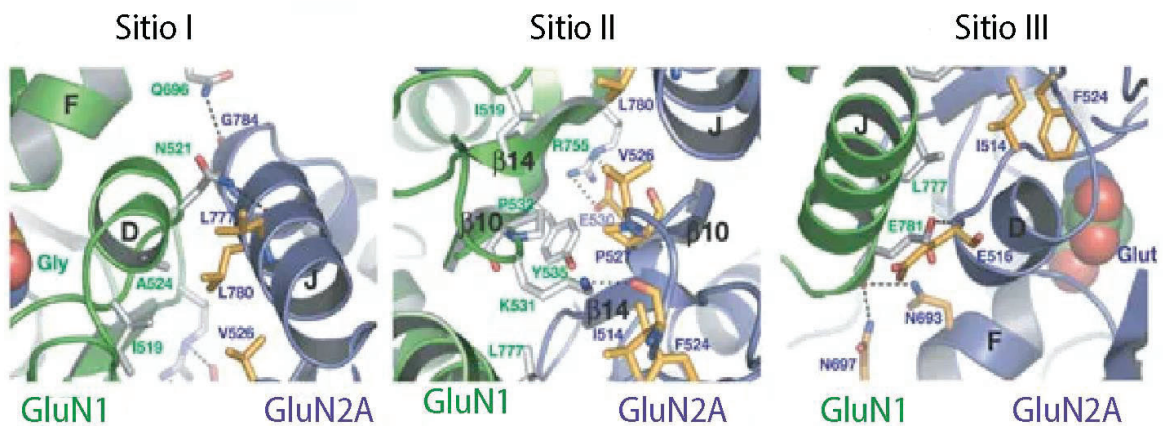
**Figura 1-8.** Sitios de unión de moduladores alostéricos en los ATDs de GluN1-GluN2B. **A)** Sitios de unión del ifenprodil (código PDB 3QEL, esferas grises) y el  $Zn^{+2}$  (código PDB 3JPY, esfera roja). **B)** El sitio de unión del ifenprodil involucra residuos de las subunidades GluN1 y GluN2B, las cuales forman interacciones hidrofóbicas y polares. **C)** Sitio de unión del  $Zn^{+2}$  en la hendidura del ATD de la subunidad GluN2B. Tomado de Hiro Furukawa 2012 (Furukawa, 2012).



En cuanto a los LBDs del NMDAR se conoce que contienen los sitios de unión ortostéricos de Glu (LBD de GluN2), Gly (LBD de GluN1) y antagonistas competitivos, además también se ha descrito que presentan sitios alostéricos para la unión de moléculas con actividad NAM y/o PAM, que en conjunto controlan la apertura del canal (He *et al.*, 2019). Según el trabajo de Furukawa *et al.* 2005 los LBDs presentan una estructura bilobulada donde los dos segmentos extracelulares (dominio 1 (S1) y dominio 2 (S2)) forman las dos mitades (Furukawa *et al.*, 2005). Además, estos autores también encontraron que el heterodímero GluN1-GluN2A cristalizaba como una unidad asimétrica, donde las dos subunidades estaban relacionadas por un pseudo eje localizado en el centro de la interfase (figura 1-9). Furukawa *et al.* clasificaron las interacciones entre los LBDs de las subunidades GluN1 y GluN2A en tres subsitios. Dentro del sitio II se incluyeron las interacciones de los residuos Y535 y P532 de GluN1 con P527 de GluN2A, un enlace de puente salino entre R755 de GluN1 y E530 de GluN2A, y un puente de hidrógeno entre K531 de GluN1 y el grupo carbonilo de la cadena carbonada de la F524 de GluN2A. Los sitios de contacto I y III fueron relacionados con interacciones hidrofóbicas entre los residuos de las hélices (D y J) de las subunidades GluN1 (I519, A524, N521, E781 y L777) con los residuos ubicados en las hélices (J y D) de las subunidades GluN2A (V526, L780, L777 y E516) (Furukawa *et al.*, 2005). Además de las anteriores interacciones, Los sitios I y III también presentaban varias interacciones polares, no solo entre el dominio 1 de cada subunidad, sino que también entre dominio 1 (hélice J) y dominio 2 (hélice F) (figura 1-10). Con base en esta información se logró demostrar que las interacciones y el arreglo básico de las subunidades en el centro del sitio de unión al Glu está conservado entre los NMDARs y no NMDARs (Furukawa *et al.*, 2005; Bledsoe *et al.*, 2019).

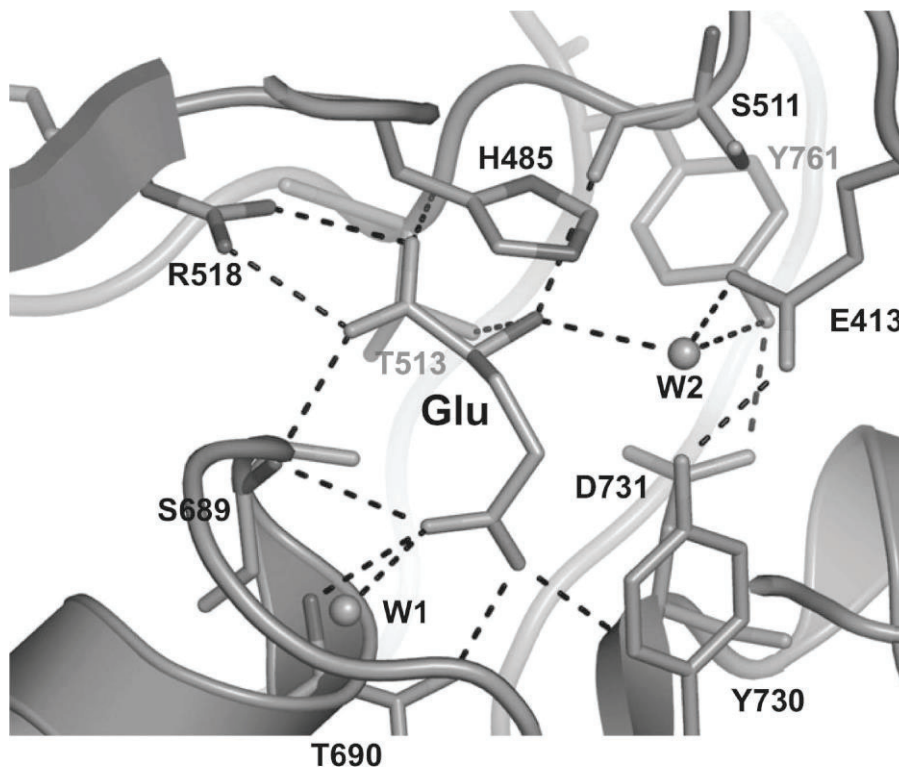


**Figura 1-9:** Representación en forma de cintas de la estructura cristalográfica (2.0 Å) de los dominios LBD de GluN1-GluN2A (código PDB 2A5T). Vista lateral del heterodímero GluN1-GluN2A en complejo con glicina y glutamato respectivamente. Tomado Furukawa et al. 2005 (Furukawa *et al.*, 2005).



**Figura 1-10:** La Interfase entre GluN1-GluN2A está separada dentro de tres diferentes sitios de contacto denotados como I, II y III. Tomado y modificado Furukawa *et al.* 2005 (Furukawa *et al.*, 2005).

De acuerdo con lo anterior, Furukawa *et al.* encontraron que la orientación adecuada para que el ligando Glu se una a la subunidad GluN2A, se da cuando su grupo  $\alpha$ -carboxilo puede interactuar con el grupo guanidinio de la R518, y su grupo  $\gamma$ -carboxilo puede interactuar con los residuos Y730 y S689 (Yu and Lau, 2018). Adicionalmente, relacionaron un puente de hidrogeno entre los residuos Y730 y E413 (inter-dominios), con el incremento en la afinidad de unión a Glu (figura 1-11).



**Figura 1-11:** Interacción de Glu con los residuos de GluN2A y dos moléculas de agua. Las líneas discontinuas representan enlaces de hidrógeno o puentes salinos. Tomado de Bonaccorso *et al.* 2011 (Bonaccorso *et al.*, 2011).

Finalmente, también se observó que la principal diferencia entre el sitio de unión de Glu en la subunidad GluN2A y las subunidades no NMDARs (GluA2, GluK1 y GluK2), es un residuo con carga negativa que participa en la unión del grupo  $\alpha$ -amino (con carga positiva) del Glu. En la subunidad GluN2A este residuo es el aspartato 731 (D731), mientras que en receptores no NMDARs el residuo equivalente es un glutamato (Furukawa *et al.*, 2005;

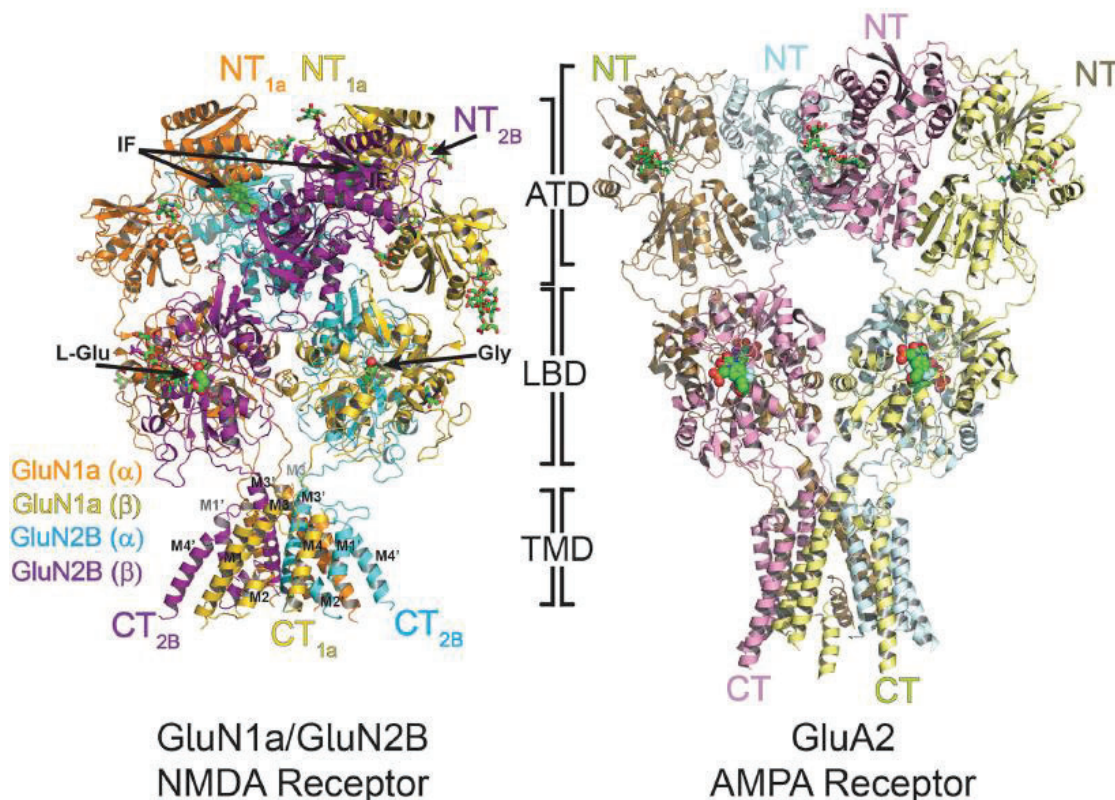
Bledsoe *et al.*, 2019). Debido a que el aspartato presente en GluN2A es un grupo metileno más corto que el glutamato presente en no NMDARs, no se forma un puente salino entre D731 y el grupo  $\alpha$ -amino del Glu como ocurre en no NMDARs. Por lo tanto, en GluN2A el grupo  $\alpha$ -amino del Glu forma puentes de hidrógeno con los residuos E413 y Y761 mediante una molécula de agua. Sorpresivamente, mutagénesis (con conservación de carga) de D731E en subunidad GluN2A y D732E en la subunidad GluN2B, genera NMDARs no funcionales, probablemente por la desorganización que ocurre en el bolsillo de unión de Glu (Bonaccorso *et al.*, 2011).

De forma interesante el hecho de que el residuo D731 presente en la subunidad GluN2A contenga una cadena lateral más corta, hace que se produzca un espacio dentro del bolsillo de unión a Glu, que permite acomodar el grupo N-metilo del compuesto N-Metil-D-aspartato (NMDA) como resultado del desplazamiento de una molécula de agua (que se une al grupo  $\alpha$ -amino del Glu). Esta característica convierte al compuesto sintético NMDA en un agonista exógeno selectivo de los receptores homónimos, debido principalmente a que su grupo N-metilo no puede ser acomodado en el bolsillo de unión a Glu de las otras subunidades de los iGluRs (Bonaccorso *et al.*, 2011).

Finalmente, en 2014 Karakas *et al* lograron elucidar la estructura del NMDAR heterotetrámero GluN1a-GluN2B con una resolución de 4Å (figura 1-12). Los autores del trabajo encontraron que el NMDAR GluN1a-GluN2B presenta una estructura general en forma de globo aerostático, donde el globo y la canasta, corresponden a los dominios extracelulares y el dominio TMD respectivamente. Estos hallazgos concuerdan con lo que han reportado recientemente otros autores que lograron obtener por criomicroscopía electrónica la estructura del NMDAR humano GluN1a-GluN2A con buena resolución (4Å) (Wang *et al.*, 2021). En la figura 1-12, también se puede observar un claro límite entre los LBDs y TMDs, mientras que los ATDs y LBDs parecen conformar una sola unidad. Además, se puede ver cómo las subunidades GluN1a y GluN2B, se ensamblan de forma escalonada en el heterotetrámero GluN1a-GluN2-GluN1a-GluN2 (1-2-1-2). Las anteriores evidencias estructurales también fueron confirmadas por Lee *et al* cuando elucidaron la estructura del NMDAR GluN1-GluN2B desde *Xenopus laevis* en complejo con: agonistas parciales, un modulador alostérico negativo y un bloqueador de poro (Lee *et al.*, 2014).

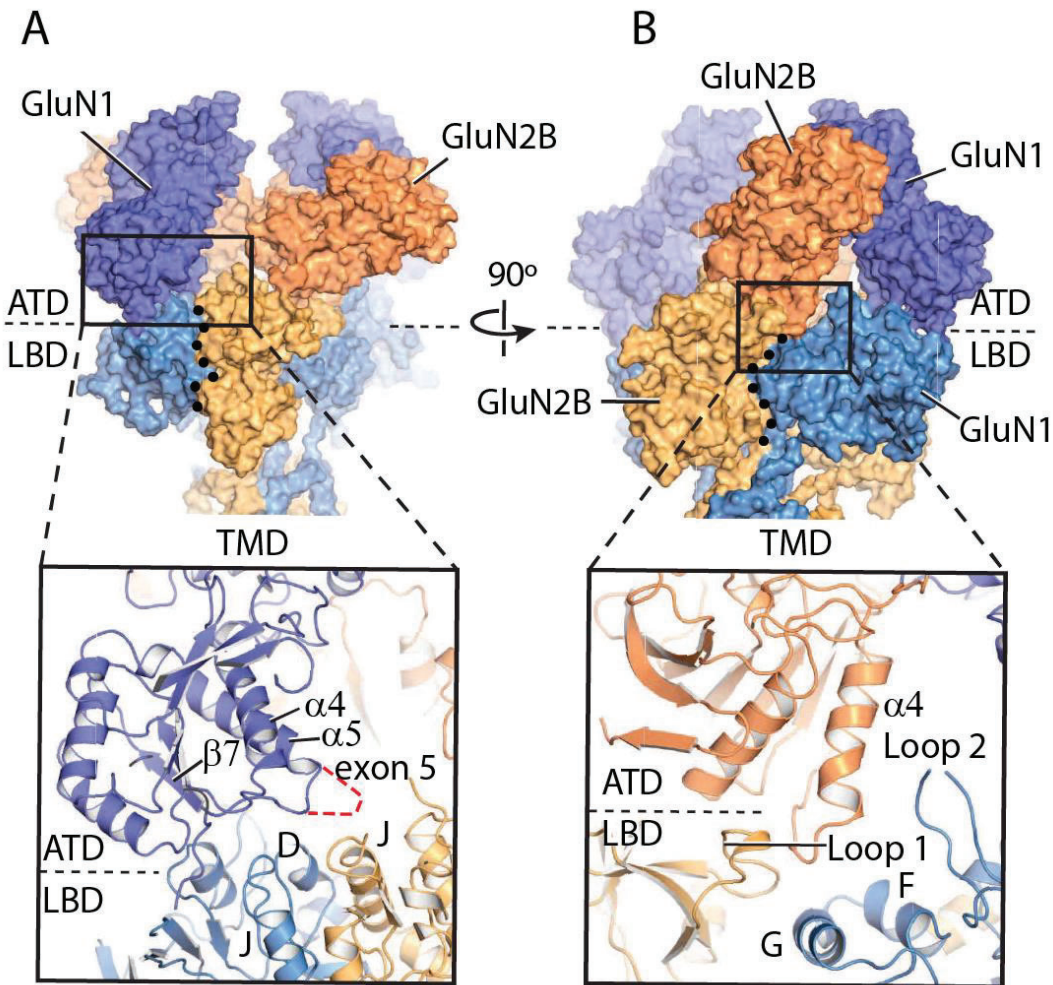


El ensamble del tetrámero como dímero de dímeros en la región extracelular del NMDAR es similar a la observada en la estructura GluA2 del AMPAR, y muy parecida a la de los otros miembros de los iGluRs. Pero a pesar de estas similitudes en el arreglo espacial de los tetrámeros, la forma general de los NMDARs GluN1a-GluN2B es distinta a la “Y” mayúscula observada en los AMPARs GluA2 (Figura 1-12). Lo anterior, puede ser debido a que los ATDs de las subunidades del NMDAR y AMPAR presentan baja identidad en la secuencia de aminoácidos, que se traduce en grandes diferencias estructurares en esta región. Cuando vemos la estructura del heterotetrámero GluN1a-GluN2B podemos identificar que estas diferencias estructurales producen un estrecho empaquetamiento de los ATDs y LBDs en el NMDAR, a diferencia de la poca interacción presente entre ATDs y LBDs en el AMPAR GluA2. Este fino empaquetamiento de los dominios extracelulares encontrado en el NMDAR podría explicar de alguna manera la regulación alostérica que sufre el canal iónico por la unión de moléculas en los ATDs de los NMDARs, que ha sido descrita como mínima e inexistente en no NMDAR (Karakas and Furukawa, 2014).



**Figura 1-12:** Estructura del heterotetrámero GluN1a-GluN2B (izquierda, PDB ID: 4PE5), comparado con la estructura del homotetrámero GluA2 del AMPAR (derecha, PDB ID: 3KG2). Tomado de Karakas y Furukawa 2014 (Karakas and Furukawa, 2014).

En relación con lo anterior, Karakas *et al* identificaron y clasificaron los sitios de mayor interacción como II y III, encontrando que estos estaban constituidos principalmente por interacciones de tipo hidrofílicas, aunque el contacto aminoácido-aminoácido no pudo ser identificado debido a limitaciones en la resolución de la estructura. De esta manera, el sitio II está formado por la interacción que se da entre el ATD de la subunidad GluN1a y los LBDs del heterodímero GluN1a-GluN2B, los cuales interaccionan a través de un *loop* (que se extiende desde la hélice  $\alpha 5$  a la hebra  $\beta 7$  en el ATD de la subunidad GluN1a) con la hélice J de la subunidad GluN2B (figura 1-13A). En el sitio III, el LBD de la subunidad GluN1a y los ATDs del heterodímero GluN1a-GluN2B interaccionan a través del *loop* 2 de la subunidad GluN1a (encontrado en la interfase de los ATDs de la subunidad GluN1a) con aminoácidos de la subunidad GluN2B (figura 1-13B). Por otro lado, la hélice F en GluN1 ha sido relacionada con el control de apertura o cierre del canal iónico, o lo que es lo mismo, en el proceso de transición del estado abierto al cerrado (y viceversa) conocido como "*gating*". Los anteriores hallazgos estructurales, permitieron demostrar que los ATDs y LBDs del heterodímero GluN1a-GluN2B son similares a los ATDs de la estructura GluN1b-GluN2B en complejo con ifenprodil, y los LBDs de la estructura GluN1-GluN2A en complejo con Gly y Glu. En términos generales los ATDs y LBDs están en un ajustado arreglo que es adecuado para la transmisión de cambios estructurales entre dominios (Karakas and Furukawa, 2014 ; Lee *et al.*, 2014).



**Figura 1-13:** Sitios de mayor interacción entre los ATDs y LBDs del heterotetrámero GluN1a-GluN2B. **A)** Sitio II, el ATD de la subunidad GluN1a y el LBD del heterodímero GluN1a/GluN2B interactúan a través de un *loop* (que se extiende desde la hélice  $\alpha 5$  a la hebra  $\beta 7$  en ATD de la subunidad GluN1a) con la hélice J de la subunidad GluN2B. **B)** Sitio III, el LBD de GluN1a y los ATDs de GluN1a-GluN2B interactúan a través del *loop* 2 de GluN1a ubicado dentro de la interfase de los ATDs de GluN1a y GluN2B. Tomado y modificado de Lee *et al.* 2014 (Lee *et al.*, 2014).

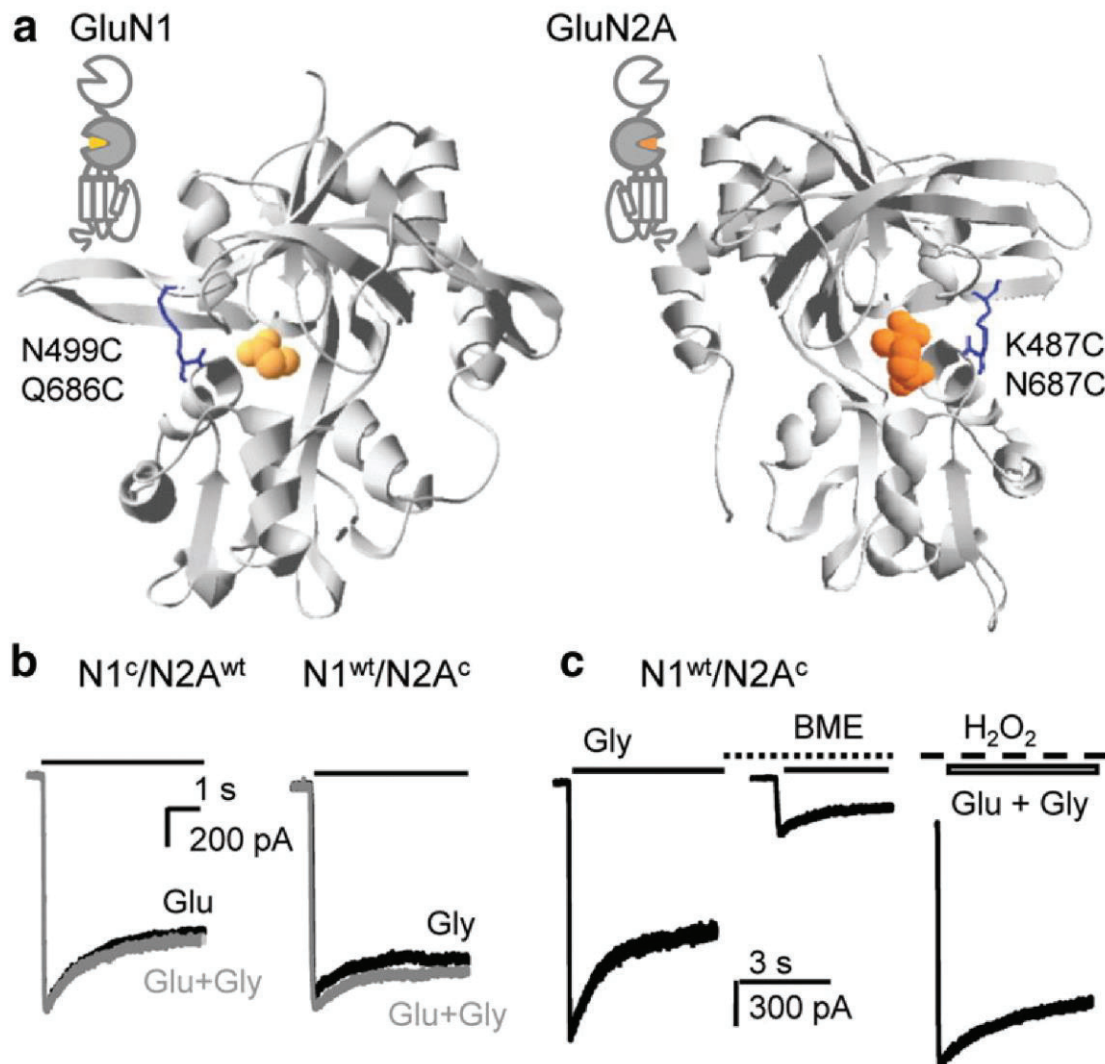
En cuanto a los TMDs del heterotetrámero GluN1a-GluN2B, Karakas *et al* encontraron que estos comparten características estructurales con el homotetrámero GluA2 del AMPAR, debido a que las hélices M3 contienen los motivos “SYTANLAAF” altamente conservados en iGluRs, y que han sido previamente relacionados con el *gating*, ya que mutaciones en esta región produce modificaciones en las propiedades del canal. Las principales diferencias entre los TMDs de los dos tipos de receptores radican en la hélice M4 de GluN2B (Lee *et al.*, 2014).

En resumen, las anteriores evidencias estructurales muestran las principales diferencias que existen entre NMDAR y no NMDAR: porque en no NMDARs el ATD no regula la actividad del canal iónico, la unión en LBD es sólo a Glu, el TMD forma un canal iónico no sensible a voltaje y con baja permeabilidad comparado con el NMDAR, y que a pesar de que los NMDARs son clasificados en la misma familia de los iGluRs, éstos presentan claras diferencias fisiológicas y farmacológicas.

### **1.4.3 Mecanismos de activación e inhibición del NMDAR**

En un principio muchos estudios estructurales habían revelado que la unión de los agonistas (Glu y Gly) a los LBDs de las subunidades GluN1 y GluN2, jugaban un papel fundamental en el cierre de los dos lóbulos extracelulares de los LBDs ( S1 y S2), lo que llevo a pensar que la conformación cerrada del NMDAR (cierre de hendidura por la unión de agonistas) promovía nuevas isomerizaciones, que desencadenaban la apertura del canal. Con el propósito de comprobar lo anterior, en 2010 *Kussius y popescu* inmovilizaron los LBDs del di-heterómero GluN1-GluN2A en la configuración cerrada (bolsillo de unión a ligando cerrado). Esto se logró mediante mutaciones de ciertos residuos por cisteínas, las cuales permitieron la formación de puentes de disulfuro entre los lóbulos LBDs de GluN1-GluN2A como se muestra en la figura 1-14a.

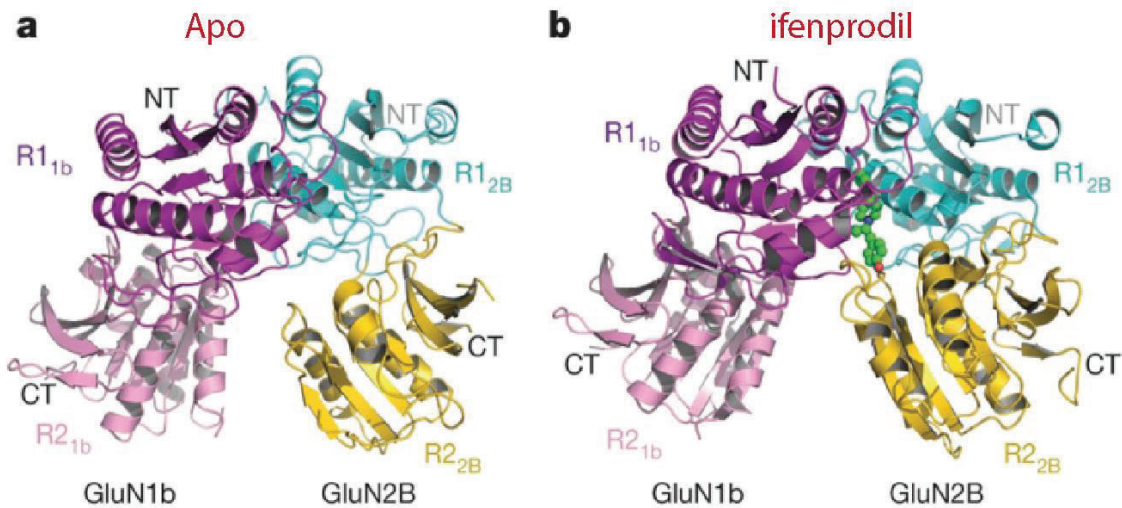




**Figura 1-14:** NMDARs con LBDs cerrados a través de puentes de disulfuro son funcionales. **a)** Los modelos estructurales de GluN1-LBD en complejo con glicina (amarillo) (PDB: 1PB7) y de GluN2A-LBD en complejo con glutamato (naranja) (PDB: 2A5S), ayudaron a predecir que los residuos de cisteína (azul) diseñados sobre los sitios de unión de agonistas en GluN1 (izquierda, posiciones N499C y Q686C) y GluN2A (derecha, posiciones K487C y N687C), están lo suficientemente cerca como para interactuar y estabilizar las conformaciones cerradas. **b y c)** Registros electrofisiológicos en la configuración *whole cell* mediante la aplicación de solo Gly, o Gly y Glu durante 5s. **c)** Ciclos de reducción (BME, 50 mM) y oxidación (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1%). Tomado de Kussius y Popescu 2010 (Kussius and Popescu, 2010).

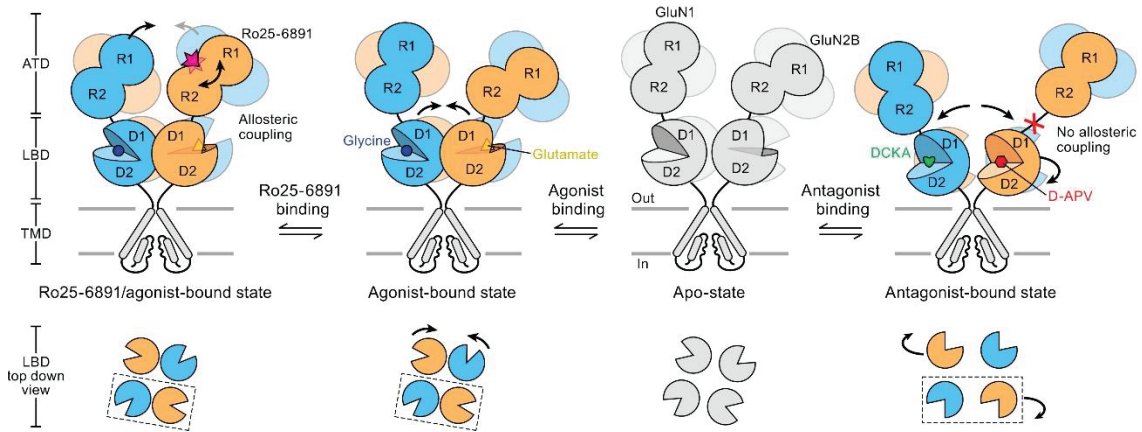
En estos estudios, las subunidades modificadas (GluN1<sup>C</sup> y GluN2A<sup>C</sup>), expresadas junto con el par *wt* requerido (GluN2A<sup>wt</sup> o GluN1<sup>wt</sup>), mostraron que la unión de los dominios LBDs de GluN1 a través de puentes de disulfuro (GluN1<sup>C</sup>) no tenían consecuencias observables en la actividad del receptor (GluN1<sup>C</sup>-GluN2B<sup>wt</sup>), mientras que la unión de los dominios LBDs de GluN2A (GluN2A<sup>C</sup>) aumentaba la actividad del canal sin reducir el número de estados cinéticos resolubles (Kussius and Popescu, 2010). En base a estos hallazgos, se sugirió que el glutamato, pero no la glicina, activa los NMDARs con una eficacia submáxima, y, por lo tanto, la baja eficacia del glutamato puede representar un mecanismo por el cual el neurotransmisor mantiene el control sobre la cinética del receptor a pesar de compartir con la glicina la tarea de la activación del canal (Kussius and Popescu, 2010).

Por otro lado, y con el propósito de brindar mayor conocimiento sobre el control del *gating* en NMDARs, y dar una explicación sobre el papel que juegan los ATDs del heterotetrámero GluN1b-GluN2B durante la apertura del canal iónico, en ausencia, y presencia de moduladores alostéricos (figura 1-15), Tajima *et al.* realizaron ensayos sobre NMDARs aplicando técnicas de difracción de rayos X, criomicroscopía electrónica y electrofisiología, con las cuales lograron demostrar que en ausencia del inhibidor alostérico ifenprodil (figura 1-15a), la estructura bilobulada (compuesta por dos regiones llamadas R1 y R2) del ATD de la subunidad GluN2B adopta una conformación abierta (hendidura abierta) que produce un reordenamiento de los ATDs en la interfase heterodimérica de GluN1-GluN2B, que desencadena en una alteración de su orientación, y por lo tanto, ayuda a la estabilización de la conformación activa del receptor, que finalmente resulta en la apertura del canal iónico, producto de la unión de los agonista Gly y Glu (Tajima *et al.*, 2016).



**Figura 1-15:** Estructura de los heterodímeros ATD de GluN1b-GluN2B. **a)** Estructura cristalina del heterodímero ATD de GluN1b-GluN2B en el estado Apo. **b)** Estructura cristalina del heterodímero ATD de GluN1b-GluN2B en complejo con ifenprodil (PDB; 3QEL). Tomado y modificado de Tajima *et al.* 2016 (Tajima *et al.*, 2016).

A pesar de que Tajima *et al.* no habían realizado estudios estructurales del *gating* con el NMDAR completo, en 2016 Zhu *et al.* reportaron las estructuras por crio-microscopía electrónica del NMDAR GluN1-GluN2B en un ensamblaje donde se encontraban unidos: a) agonistas fisiológicos (glicina y glutamato), b) agonistas fisiológicos y el inhibidor alostérico Ro25-698, y c) antagonistas competitivos del sitio de unión de glicina (DCKA) y glutamato (D-APV). Este trabajo se realizó con el objetivo de conocer por qué la unión de pequeñas moléculas en el NMDAR activaban o inhibían el *gating* del canal iónico, es decir cómo sucedían las transiciones entre los estados activos e inactivos del NMDAR en ausencia y presencia de estos moduladores alostéricos (figura 1-16) (Zhu *et al.*, 2016).

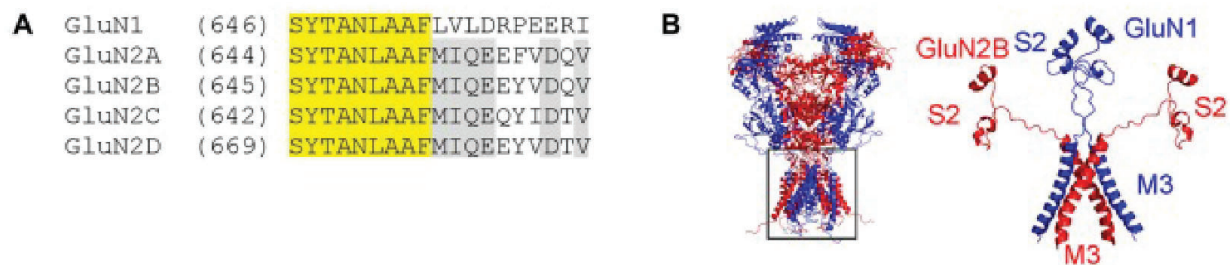


**Figura 1-16:** Esquema general de los cambios conformacionales de los dominios extracelulares del NMDAR. Tomado Zhu *et al.* 2016 (Zhu *et al.*, 2016).

En la figura 1-16, se observa que la unión de antagonistas competitivos al NMDAR, da como resultado la distorsión del anillo de activación formado por los LBDs (conformación abierta), este cambio de conformación del NMDAR hace que no se produzca la apertura del canal iónico. También, se puede observar como la unión de los agonistas fisiológicos retiene el anillo formado por los LBDs, y de esta manera se favorece la configuración de dímero de dímeros (conformación cerrada), que produce la activación del canal. Finalmente, la figura 1-16 también muestra como la unión del inhibidor alostérico Ro25-6891 en el ATD estabiliza aún más la capa de los LBDs (conformación alostéricamente inhibida), impidiendo de esta manera que los LBDs produzcan el movimiento de los TMDs que conllevan a la apertura del canal iónico. Lo anterior, llevó a sugerir a Zhu *et al.* que el anillo formado por los LBDs es fundamental para la transducción de señales que controlan el *gating* en los NMDARs (Zhu *et al.*, 2016).

Hasta este momento todos los estudios estructurales y funcionales con miras a revelar los cambios de conformación que sufría el NMDAR en los estados activos, Apo e inhibido, se habían centrado sobre todo en la interconexión que existía entre los dominios extracelulares (ATD y LBD). Debido a este hecho, y sumando la limitación de que no se contaba con una estructura de alta resolución de los *linkers* S2-M3 del NMDAR, Ladislav *et al.* realizaron mutaciones, y deleciones de diferentes aminoácidos presentes en los *linkers* S2-M3 de las subunidades GluN1 y GluN2B (figura 1-17). Sorprendentemente estas mutaciones condujeron a la apertura constitutiva del canal, encontrándose que, independiente de si las mutaciones se realizaban sobre los *linkers* S2-M3 de las

subunidades GluN1 o GluN2B, la estimulación con Glu o Gly promovía la activación del canal, aunque las respuestas inducidas por la aplicación de Gly fueron mayores. Lo anterior, logro demostrar que las subunidades GluN1 y GluN2, desempeñan diferentes roles en el control del *gating* del NMDAR, lo que podría contribuir al entendimiento del mecanismo molecular de acoplamiento alostérico entre los sitios de unión de Gly y Glu. Además, también se observó que este efecto era más acentuado cuando se modificaban los residuos L657 (GluN1) y I655 (GluN2B) por Gly, y estas dos interacciones fueron llamadas como motivo LILI. Finalmente, ellos realizaron estudios de modelamiento molecular con los cuales encontraron que el motivo LILI forma una unidad funcional con el anillo TTTT (T648 (GluN1) y T647 (GluN2B)) del motivo SYTANLAAF, que ha sido previamente descrito como importante en el control del *gating* de los NMDARs (Ladislav *et al.*, 2018).



**Figura 1-17: A)** Alineamiento de secuencias de aminoácidos para un segmento de la región formadora del poro S2-M3. Los motivos conservados en los NMDARs son coloreados en amarillo (GluN1-GluN2) y gris (GluN2A-D). **B)** Modelos de homología de GluN1-GluN2B y la estructura de los *linkers* S2-M3. Tomado y modificado de Ladislav *et al.* 2018 (Ladislav *et al.*, 2018).

#### 1.4.4 Funciones del NMDAR

Como se ha mencionado anteriormente, los NMDARs no sólo intervienen en la transmisión rápida de la información entre neuronas, sino que, gracias a su alta permeabilidad al ion  $\text{Ca}^{2+}$  activan numerosas rutas intracelulares de señalización que desencadenan procesos fisiológicos muy importantes como la plasticidad sináptica (Yamamoto *et al.*, 2015; Volk *et al.*, 2015). La plasticidad sináptica se inicia con una cascada de eventos que desemboca en la modificación drástica de la eficacia sináptica y la morfología neuronal. Estos procesos fisiológicos producto de la activación de los NMDARs se desencadenan en función de la cantidad y la cinética de la entrada de calcio, y, dependiendo de cómo sea su activación



pueden provocar o bien una potenciación a largo plazo (LTP) o una depresión a largo plazo (LTD). La potenciación ocurre cuando existe una entrada rápida y sostenida de calcio a través del NMDAR, lo que facilita el fortalecimiento sináptico (por ejemplo, la LTP característica que se da en la sinapsis entre los terminales colaterales de Schaffel y las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo) (Sanz-Clemente *et al.*, 2013). Esta potenciación se ve reflejada en un aumento del número de AMPARs ensamblados en la membrana postsináptica y, por lo tanto, en un aumento de la respuesta postsináptica. Por el contrario, una menor entrada de calcio durante un largo periodo de tiempo a través de los NMDARs desencadenará la generación de una LTD, que disminuirá la eficiencia sináptica a través de la eliminación de los AMPARs de la membrana postsináptica y la contracción de las espinas dendríticas (Sanz-Clemente *et al.*, 2013).

Durante los últimos años, las subunidades GluN2A y GluN2B han sido objeto de muchas investigaciones, ya que ambas están altamente expresadas en la corteza y el hipocampo, donde desempeñan un papel central sobre la función sináptica debido a que controlan los procesos de plasticidad y metaplasticidad (Sanz-Clemente *et al.*, 2013). A pesar de que el glutamato presenta mayor afinidad por la subunidad GluN2B que por la GluN2A, en neuronas maduras durante la liberación del glutamato se observa una mayor activación de los NMDARs postsinápticos conformados con las subunidades GluN2A, en comparación con los NMDARs postsinápticos que contienen las subunidades GluN2B. Este hecho aparentemente contradictorio, se ha relacionado principalmente con la localización subcelular de los NMDARs que están formados con las subunidades GluN2A, puesto que al encontrarse mayoritariamente sobre sitios sinápticos se ve favorecida su activación, a diferencia de los receptores conformados con GluN2B que generalmente se encuentran en mayor proporción sobre los sitios extrasinápticos (Kew *et al.*, 1998). Reforzando la anterior observación se encuentra el hecho que los di-heterómeros GluN1-GluN2A poseen una mayor probabilidad de apertura del canal y un menor tiempo de desactivación en relación con los di-heterómeros GluN1-GluN2B, lo que tendría mayores implicaciones sobre la integración dendrítica, el refinamiento de los circuitos y la plasticidad sináptica (Yashiro and Philpot, 2008).

En concordancia con lo anterior, experimentos realizados con ifenprodil, un compuesto con actividad alostérica negativa selectiva hacia los NMDARs ensamblados con la subunidad GluN2B, han evidenciado que este compuesto solo bloquea aproximadamente el 30% de

las corrientes excitatorias postsinápticas mediadas por los NMDARs (NMDAR-EPSC) en neuronas maduras, lo que indicaría la presencia predominante de los di-heterómeros GluN1-GluN2A en una localización sináptica (Kew *et al.*, 1998). Experimentos similares apoyan la existencia de los di-heterómeros GluN1-GluN2B en sitios extrasinápticos, ya que el bloqueo irreversible de los NMDARs sinápticos (mediante la incubación con el bloqueador MK-801, que tan sólo actúa sobre la forma activa del NMDAR) demuestran que, una población de NMDARs que aún pueden ser activados (es decir, extrasinápticos), son sensible al ifenprodil. A pesar de esto, es importante mencionar que, otros trabajos han descrito que una gran población de los NMDARs presentes en sitios sinápticos son tri-heteroméricos (GluN1-GluN2A-GluN2B) (Rauner and Köhr, 2011) y debido a que el perfil farmacológico de estos tri-heteroméros es diferente al mostrado por los di-heterómeros GluN1-GluN2B es difícil saber y afirmar que la localización subcelular de los NMDARs es absoluta, ya que se han identificado en neuronas la presencia de NMDARs extrasinápticos ensamblados con GluN2A, y NMDARs sinápticos ensamblados con GluN2B (Kew *et al.*, 1998; Sanz-Clemente *et al.*, 2013).

Sin embargo, las vías de señalización mediadas por los NMDARs dependen en gran medida de los tipos de NMDARs (sinápticos o extrasinápticos) que se activen. Mientras que la activación de los NMDARs sinápticos se ha relacionado con cascadas de señalización intracelulares que promueven la supervivencia celular, la entrada de calcio a través de los NMDARs extrasinápticos se asocia con procesos de muerte neuronal a través de la disfunción mitocondrial (un proceso conocido como excitotoxicidad) (Hardingham and Bading, 2010). De hecho, en los últimos años, diversas evidencias experimentales demuestran que muchas condiciones patológicas están relacionadas con defectos sinápticos producto de la disfunción del NMDAR. De aquí la importancia del desarrollo de nuevos compuestos con actividad moduladora dirigida hacia los NMDARs, como posible estrategia para el tratamiento de estas condiciones patológicas que afectan SNC.

### 1.4.5 Farmacología del NMDAR

Como se ha mencionado anteriormente, los NMDARs están considerados como importantes dianas para la intervención terapéutica de muchas enfermedades derivadas de su disfunción. Los agentes farmacológicos que actúan sobre el NMDAR pueden ser agonistas, antagonistas competitivos, bloqueadores del canal o moduladores alostéricos (PAMs o NAMs). La unión de los agonistas en los LBDs de las subunidades GluN1 y GluN2, estabilizan la conformación activa del receptor que transmite alostéricamente cambios a los TMDs que conducen a la apertura del canal (Burnell *et al.*, 2019). En cuanto a los antagonistas competitivos la unión de estos compuestos en el mismo sitio donde se unen los agonistas fisiológicos del NMDAR impide la formación de esta conformación activa del receptor. Entre los agonistas más conocidos se encuentran los que se unen a la subunidad GluN1: Gly, D-serina y D-Cicloserina (Maolanon *et al.*, 2017), y los que se unen a las subunidades GluN2: L-Glu, NMDA y D-Asp (GluN2) (Bonaccorso *et al.*, 2011). Por otro lado, los antagonistas competitivos más documentados son el ácido 7-clorokinurénico (7-CK) y el ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico (AP-5), que son a su vez antagonistas competitivos de los sitios de unión de Gly en GluN1 y Glu en GluN2 (Lodge *et al.*, 1988 ; Frankiewicz, Pilc and Parsons, 2000). Otro grupo de compuestos que afectan la actividad del NMDAR son los bloqueadores del poro, que son, como su nombre indica, compuestos que se unen dentro del vestíbulo del canal iónico, y bloquean físicamente el flujo de iones. Estos compuestos han sido muy investigados para el tratamiento de varias condiciones neuropatológicas, y actualmente son utilizados clínicamente como agentes anestésicos disociativos, dentro de los que más se conocen están la fenciclidina (PCP), MK-801, tionil-ciclohexil-piperidina (TCP) y Ketamina. A pesar de algunos de estos compuestos presentan actividad voltaje dependiente, tienen el problema de que producen efectos adversos debido a la excesiva inhibición, y a la poca especificidad hacia los diferentes ensamblajes del NMDAR ( Song *et al.* 2018).

En cuanto a los moduladores alostéricos (PAMs y NAMs) estos son un grupo de compuestos que actúan sobre diferentes sitios del NMDAR, y potencian o inhiben alostéricamente el efecto de los agonistas, modulando de esta manera la actividad del canal. Estos tienen varias ventajas para ser desarrollados como agentes terapéuticos, ya que, a diferencia de los otros agentes farmacológicos, estos presentan generalmente una

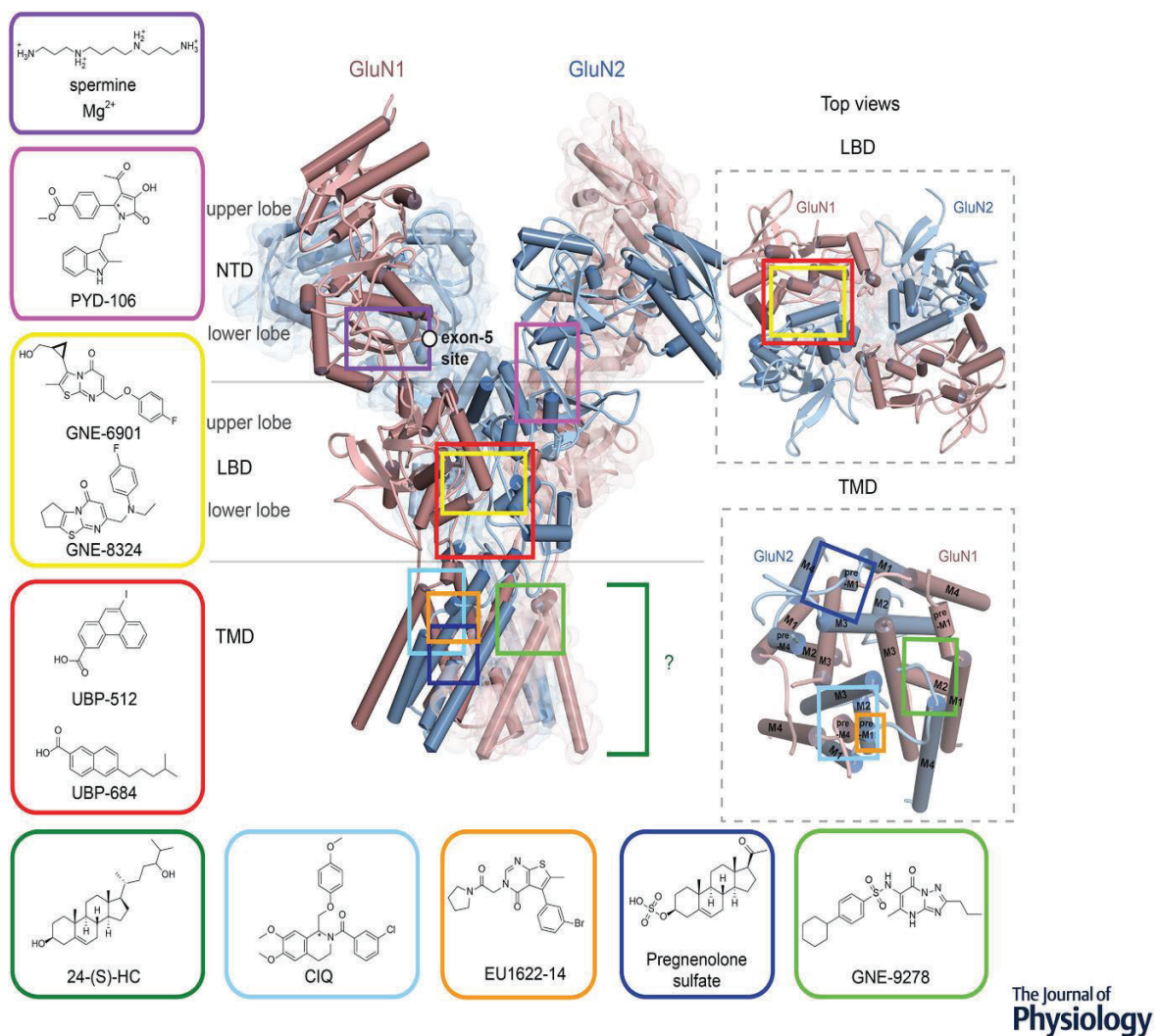


mayor selectividad hacia un tipo de subunidad (GluN2A, GluN2B, GluN2C o GluN2D). Esta actividad selectiva que exhiben los moduladores alostéricos es debida a que estos compuestos se unen en regiones distintas al sitio de unión de ligandos y el poro del canal iónico, que son conocidas por estar altamente conservadas en los NMDARs. Lo anterior, previene acciones farmacológicas no específicas, y por lo tanto efectos secundarios no deseados (Burnell *et al.*, 2019).

Los moduladores alostéricos que han sido más estudiados son el ifenprodil (IF) y el  $Zn^{2+}$ , los cuales se unen en los ATDs de los NMDARs e inhiben selectivamente, y de forma no competitiva las subunidades GluN2B (figura 1-9B) y GluN2A (figura 1-9C) respectivamente. Las diferentes selectividades del  $Zn^{2+}$  y el ifenprodil por las subunidades GluN2A y GluN2B, han permitido distinguir los receptores que están ensamblados con estas subunidades. Sin embargo, la presencia de receptores tri-heteroméricos GluN1-GluN2A-GluN2B complica la interpretación de los resultados farmacológicos, ya que los receptores compuestos por las subunidades GluN1-GluN2A-GluN2B se unen tanto al  $Zn^{2+}$  y al ifenprodil con alta afinidad, pero la inhibición máxima es débil (~ 20%). Por lo tanto, esta baja sensibilidad al ifenprodil no necesariamente significa que las subunidades GluN2B estén ausentes, sino que podría ser un indicativo de un co-ensamblaje con otras subunidades (Hansen *et al.*, 2014).

Estudios recientes en el campo de los moduladores alostéricos para el NMDAR, han permitido encontrar nuevos compuestos con actividades PAMs y/o NAMs, entre los cuales sobresalen: a) los NAMs : TCN-201, MPX-004, MPX-007 y UBP608. b) los PAMs : GNE-6901, sulfato de pregnenolona 1 (PS), EU1622-14 y UBP684 (Zhu and Paoletti, 2015; Geoffroy, Paoletti and Mony, 2021). Además, estos estudios también han demostrado que los NAMs tienen el potencial de inhibir menos del 100% de la respuesta de los agonistas, por lo que se preserva algo de la función del canal, evitando de esta manera un bloqueo excesivo. Por lo que, estos NAMs deberían presentar un mejor perfil de seguridad que los antagonistas competitivos y los bloqueadores del poro que potencialmente pueden eliminar toda actividad de los NMDARs. Los agonistas parciales del sitio de unión a ligando también promueven niveles de actividad intermedios, pero a diferencia de los NAMs, los agonistas parciales podrían activar también receptores inactivos (Mony *et al.*, 2009). En cuanto a los PAMs (figura 1-18) se ha encontrado que estos también ofrecen distintas ventajas en el

tratamiento de enfermedades que están relacionadas con la hipofunción del NMDAR, como la disfunción cognitiva, GRINpatías y la esquizofrenia, donde se espera que el aumento de la actividad de los NMDARs mediada por los PAMs, restablezcan el adecuado funcionamiento del receptor, y produzca mejoras sustanciales de estas enfermedades. En este mismo sentido a diferencia de los PAMs, los agonistas del NMDAR activarían los receptores apropiados e inapropiados y, por lo tanto, podría causar excitotoxicidad (Perszyk *et al.*, 2020; Burnell *et al.*, 2019; Geoffroy, Paoletti and Mony, 2021).



**Figura 1-18:** Diferentes moduladores alostéricos positivos (PAM). Tomado de Geoffroy *et al.*, 2021 (Geoffroy, Paoletti and Mony, 2021).

## 1.4.6 Estudio del funcionamiento de los NMDARs

Los NMDAR pueden ser estudiados mediante técnicas electrofisiológicas *patch clamp* y métodos *in silico* como docking molecular y/o dinámica molecular.

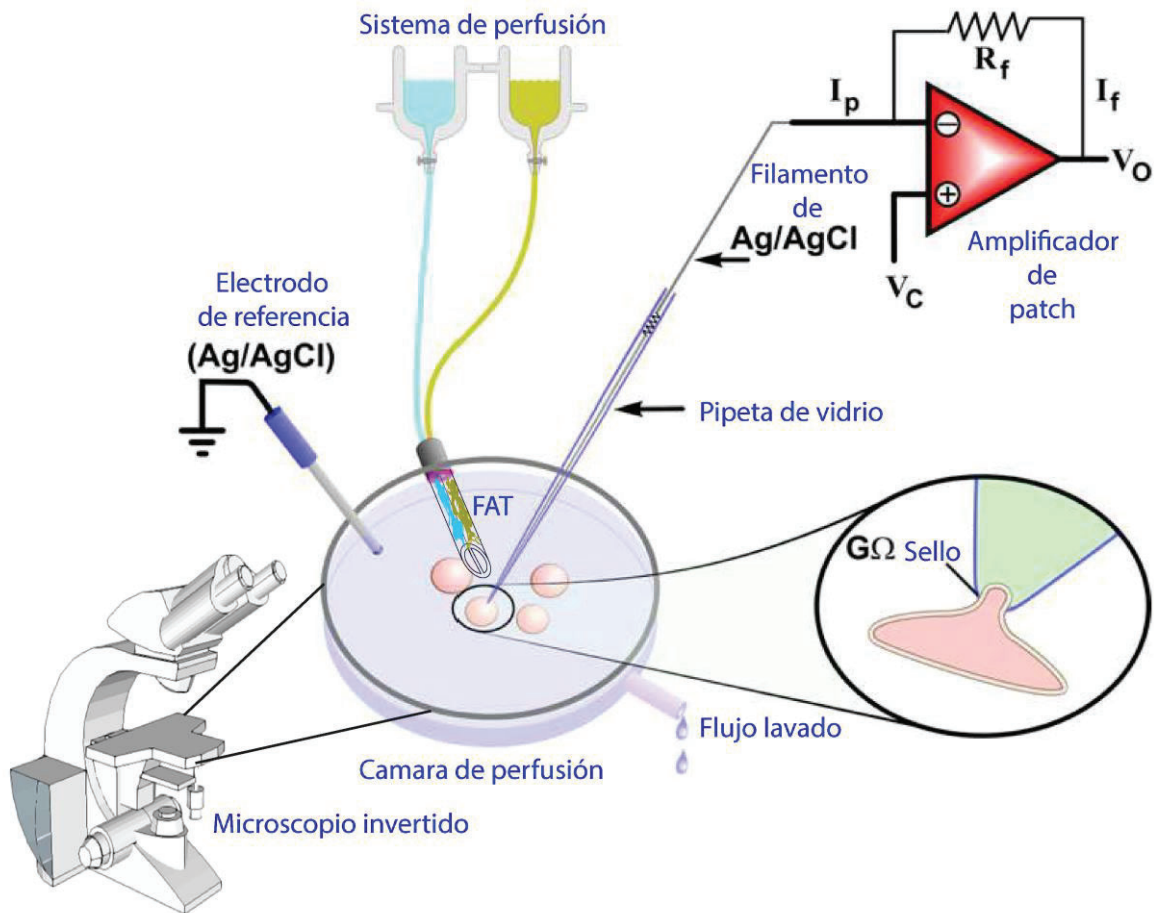
### 1.4.6.1 Patch clamp

Desde la invención del *patch-clamp* (fijación de voltaje en parches de membrana) a finales de la década de 1970 (Neher, Sakmann and Steinbach, 1978), esta técnica se ha utilizado cada vez más en la investigación de cuestiones bio-científicas relacionadas con los canales iónicos. Aunque la técnica de *patch-clamp* fue utilizada en sus inicios casi exclusivamente en laboratorios biofísicos especializados, en años posteriores se extendió a muchos otros campos como: la biología, la investigación básica en medicina y otras áreas relacionadas (Molleman, 2003). Además, los avances en el campo de la biología molecular han supuesto un gran impulso en los estudios de electrofisiología, ya que en la actualidad es posible expresar canales iónicos en sistemas de expresión como en oocitos de *Xenopus* o en líneas celulares como HEK-293T, lo cual ha contribuido en gran medida a un mayor conocimiento del funcionamiento de estos ensamblajes proteicos (Molleman, 2003).

En primer lugar, es importante resaltar que el fenómeno eléctrico en los sistemas biológicos no es mediado por el movimiento de electrones como ocurre en los metales o superconductores. En los organismos vivos este fenómeno ocurre por el movimiento de iones debido al gradiente electroquímico entre el medio intra y extracelular. Esto induce la difusión espontánea de los iones (movimiento de iones impulsado por un gradiente de concentración o eléctrico donde no se produce un gasto de energía) a través de los canales iónicos ensamblados en la membrana celular. Esta actividad de los canales iónicos puede ser medida como resultado de los cambios que ocurren en el potencial de membrana. En otras palabras, los cambios que ocurren en el potencial de membrana son efectos directos de la actividad de los canales iónicos, por lo que, la medida y cuantificación de este parámetro (corrientes iónicas) es un importante indicador de significancia biológica (Molleman, 2003; Conforti, 2012).

La modalidad de *patch-clamp* más utilizada de manera habitual es *voltage clamp*, en la cual se controla el potencial de membrana (se fija un potencial de membrana y se mantiene), mediante un sistema electrónico retroalimentador que realiza medidas del potencial de membrana durante los experimentos, y lo compara con un potencial previamente establecido (generalmente -60 mV), y, los cambios que se producen en el potencial de membrana debido al flujo de iones, son corregidos instantáneamente mediante la inyección de una corriente compensatoria por el sistema de registro. Esta corriente inyectada es exactamente igual a la corriente (movimiento de iones) que fluye a través de los canales iónicos de la membrana plasmática que están siendo estudiados, pero con signo opuesto. Por otro lado, los experimentos de *patch-Clamp* en los que el potencial de membrana no se fija y es el parámetro a estudiar, ya sea mediante la inyección de una cantidad de corriente fija o sin la mencionada inyección de corriente, se conoce con el nombre de *current clamp* (Molleman, 2003; Conforti, 2012). Como se ha mencionado al principio de este párrafo, una gran mayoría de los experimentos que se realizan mediante *patch-Clamp* son en la modalidad de *voltage clamp*.

Una de las características del *patch-clamp* que la convierte en una técnica tan poderosa es, mediante el uso de diferentes modalidades y configuraciones, que permite al experimentador: **a)** estudiar canales a diferentes niveles, ya sea registrando todos los canales de una célula en la configuración *whole cell* o registrando canales individuales mediante las configuraciones de *cell-attached*, *outside-out* o *inside-out*, y **b)** manipular fácilmente la composición del medio intracelular o extracelular de una célula durante un registro en función de la configuración utilizada. En la figura 1-19 se muestra el esquema del *set-up* utilizado para los experimentos de *patch-clamp*, donde se puede observar cómo se logra obtener un sello de alta resistencia, el cual ocurre cuando se une la punta de una micropipeta con la superficie de la membrana celular, lo cual permite aislar una pequeña área de la membrana (*patch*), sobre la que posteriormente se le controla el voltaje, mientras simultáneamente se van registrando las corrientes evocadas de los canales iónicos presentes en este parche (Conforti, 2012). Los pasos en los cuales se mide el voltaje e inyecta corriente para mantenerlo en el valor previamente fijado, son realizados por el electrodo de Ag/AgCl que se encuentra dentro de la pipeta de registro (fabricada con un capilar de vidrio) (figura 1-19).

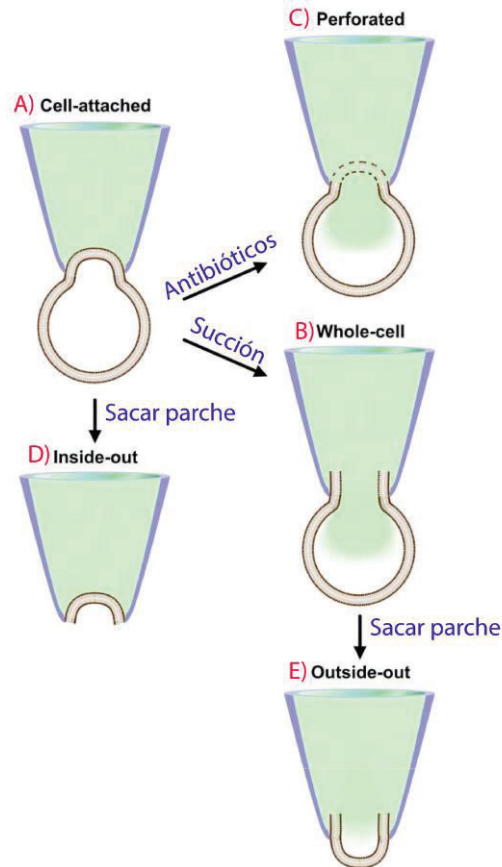


**Figura 1-19:** Esquema general de un *set-up* para *patch-clamping*. El primer paso para realizar la técnica del *patch-clamp* se basa en la formación de un sello de alta resistencia eléctrica ( $1\text{G}\Omega$ ; "gigasello") entre el borde de una micropipeta de vidrio y la membrana de una célula. Esta micropipeta de vidrio está llena de una solución interna, cuya composición puede variar en función de las corrientes iónicas que se quieran estudiar. La actividad de los canales iónicos es inducida bien por la administración de un pulso de voltaje (canales dependientes de voltaje) o por fármacos (canales activados por ligando), las variaciones en el potencial de membrana, debidas al paso de iones a través de la membrana plasmática se controla mediante la inyección de corriente a través del electrodo de Ag/AgCl presente en la micropipeta de vidrio. Tomado y modificado de Laura Conforti 2012 (Conforti, 2012).

Las distintas configuraciones de *patch-clamp* que se utilizan para estudiar diferentes tipos de canales iónicos, tienen ventajas y desventajas (Conforti, 2012). Todos los experimentos de *patch-clamp* comienzan con la configuración de *cell-attached*, mediante la formación de un sello de alta resistencia eléctrica ( $1\text{G}\Omega$ ; "gigasello") entre el borde de una micropipeta de vidrio y la membrana de una célula (Figura 1-20A). Esta configuración permite registrar corrientes unitarias generadas por la activación de un solo canal en el parche, por lo tanto,



es ideal para estudiar propiedades electrofisiológicas de un canal aislado (Neher, Sakmann and Steinbach, 1978). Las principales desventajas de esta configuración son que no permite la manipulación del medio intra y extracelular, ni controlar el potencial de membrana de la célula, debido a que no hay contacto eléctrico entre el medio intra y extracelular de la célula (Molleman, 2003).



**Figura 1-20:** Diferentes configuraciones de *patch-clamp*. En el esquema se muestran las configuraciones **A) Cell attached**, **B) Whole cell**, **C) Perforated**, **D) Inside out** y **E) Outside out**. La pipeta de registro está coloreada en azul y la solución intracelular en verde. Tomado y modificado de Laura Conforti 2012 (Conforti, 2012).

En otras configuraciones, cuando el parche de la membrana dentro de la pipeta (la mencionada configuración de *cell-attached*) se rompe, se consigue que la solución de la pipeta entre en contacto directo con el citoplasma. De esta manera, el electrodo de la pipeta de registro dentro de la pipeta, y por lo tanto del citoplasma, estará eléctricamente conectado con el electrodo de referencia (tierra) del medio extracelular, lo cual permitirá medir o registrar directamente las corrientes que atraviesen la membrana (o bien el potencial de membrana en el modo de *current clamp*). Ésta, se conoce como configuración

de célula entera (*whole cell*), y permite registrar la corriente de todos los canales funcionales presentes en la membrana celular una vez se activan cuando se usa la modalidad de *voltage clamp* (figura 1-20B). Una desventaja de esta configuración es que ocurre una rápida diálisis de componentes y factores intracelulares como segundos mensajeros ( $\text{Ca}^{+2}$ ), moléculas energéticas (ATP, GTP), proteínas como por ejemplo quinasas y fosfatasas e incluso orgánulos celulares, todos ellos descritos anteriormente como importantes para el correcto funcionamiento de ciertos canales iónicos (Molleman, 2003). Una de las principales consecuencias de esta dilución de componentes citoplasmáticos es la desaparición (*run-down*) de las respuestas evocadas de los receptores en estudio, lo cual puede reducir en ocasiones el tiempo de experimentación (Conforti, 2012). Con el fin de resolver este problema se desarrolló una variante de la configuración *whole cell*, denominada parche perforado (*perforated patch*), en la cual se emplean sustancias como la anfotericina B o nistatina para formar poros en la membrana celular que permiten el paso de ciertos iones, lo que facilita el acceso eléctrico al interior de la célula sin necesidad de romper la membrana contenida en la pipeta (figura 1-20C). La anfotericina B y la nistatina son moléculas anfipáticas capaces de insertarse en las membranas celulares y modificar su permeabilidad mediante la formación de poros iónicos. Esta configuración permite medir las corrientes de todos los canales iónicos presentes en la célula, pero la dilución de los componentes del citoplasma no sucede (Conforti, 2012).

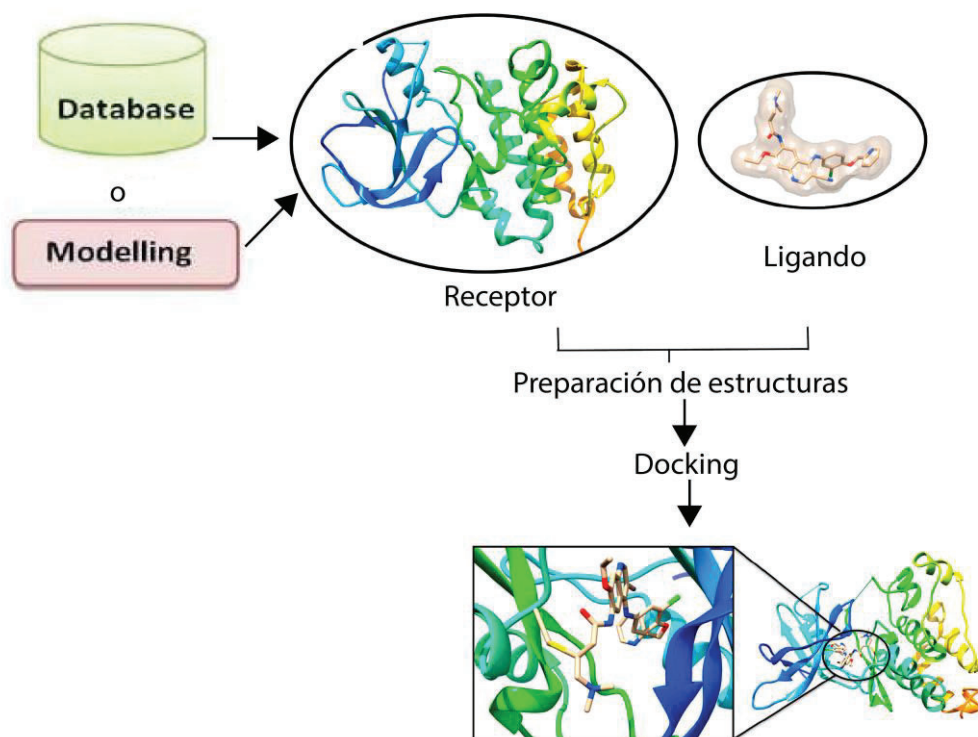
La configuración de parche escindido la parte citosólica de la membrana celular hacia el baño presente en la cámara de registro (*inside-out patch*), se consigue a partir de la configuración *cell-attached* cuando se realiza la separación mecánica de la micropipeta de la célula, lo que conduce a la formación de una vesícula en la punta de la micropipeta, que, tras ser expuesta al aire, se destruye dejando un parche de membrana dentro de la pipeta. En esta configuración la cara citosólica del parche de membrana queda expuesta a la solución del baño (con la solución intracelular), mientras que la cara externa queda en contacto con la solución contenida en la pipeta de registro (extracelular) (figura 1-20D). La configuración de parche escindido la parte extracelular de la célula hacia afuera (*outside-out patch*)(figura 1-20E), se consigue a partir de la configuración *whole cell* y corresponde a la situación inversa de *inside-out patch* (Conforti, 2012).

### 1.4.6.2 Acoplamiento molecular o *docking*

El acoplamiento molecular o *docking* es un método computacional (*in silico*) que predice la orientación más favorecida de un ligando que participa en la unión a un receptor determinado (Chaudhary and Mishra, 2016). Para determinar los sitios de unión más probables entre el complejo ligando-receptor, se utilizan algoritmos que permiten encontrar las interacciones moleculares más favorecidas energéticamente. Con estos algoritmos de acoplamiento y funciones de puntuación o *scoring*, la técnica busca generar de forma aproximada la conformación más favorable del complejo ligando-receptor, analizando para ello diversas características y propiedades de las moléculas implicadas, lo cual permite estimar la energía libre del complejo (Ferreira *et al.*, 2015). Esta herramienta bioinformática ha permitido estudiar diversas moléculas con actividad biológica selectiva con relativa rapidez y bajos costos. Aunque esta herramienta permite encontrar posibles compuestos candidatos a ser utilizados terapéuticamente, se hace necesario, como en todas las aproximaciones *in silico*, que estos resultados de *docking* sean validados mediante ensayos experimentales (Macalino *et al.*, 2015).

Para realizar un *docking* se deben conocer las estructuras tridimensionales de las moléculas involucradas (ligando y receptor) mediante métodos experimentales que permitan altas resoluciones como es el caso de la cristalografía de rayos x o la resonancia magnética nuclear, o en su defecto, se pueden modelar por un programa bioinformático que genere resultados con altos *scoring* de calidad. Esta representación tridimensional brinda información de la organización espacial de los átomos y moléculas, que en conjunto crean las estructuras funcionales de las macromoléculas que son responsables de las diferentes actividades biológicas (agonista, antagonista y modulador alostérico), y, por lo tanto, sobre estas regiones se dirige inicialmente el *docking* (figura 1-21). Tanto para el ligando como para el receptor se deben tener en cuenta los estados de protonación y la flexibilidad de las estructuras, ya que estos parámetros aseguran la correcta interacción entre los residuos de las dos moléculas. Los algoritmos que asumen la conformación rígida del receptor permiten un estudio exploratorio de las interacciones ligando-receptor de manera rápida, ya que si se asume flexibilidad en la estructura del receptor, se incrementa el tiempo que emplea el algoritmo del programa para calcular las diferentes conformaciones, y por lo tanto, esto se traduce en un alto gasto computacional para generar los resultados de acoplamiento molecular (Macalino *et al.*, 2015).





**Figura 1-21:** Esquema general para realizar un *docking* molecular. Tomado y modificado de Kumalo *et al.* 2015.

### 1.4.6.3 Dinámica molecular (MD)

La simulación de MD es una herramienta bioinformática teórica y rigurosa que, cuando se usa adecuadamente, puede proporcionar resultados fiables en la relación estructura-función de las proteínas. Se han diseñado simulaciones de MD sobre sistemas de proteínas individuales, complejos proteína-ligando y proteína-proteína, lo cual ha permitido la identificación de nuevos compuestos con una actividad biológica específica o la mejora de la actividad de compuestos líderes, lo anterior, como resultado de la identificación de las interacciones involucradas en la unión del ligando sobre un receptor de interés farmacológico (Lazim, Suh and Choi, 2020).

La MD permite analizar el comportamiento o evolución de un sistema biológico a largo del tiempo mediante el cálculo de las fuerzas entre los átomos que lo conforman, este tipo de cálculos están basados en la mecánica clásica (ecuaciones del movimiento de Newton).

Y, por lo tanto, los átomos del sistema biológico (ligando-proteína) son considerados como esferas rígidas a las cuales se les asigna una carga parcial constante. Debido a que la energía potencial del sistema biológico va a depender de la posición relativa de los átomos, la precisión del campo de fuerza que describe las interacciones enlazantes (energía potencial de enlace entre dos átomos, de ángulo entre tres átomos y de ángulo diedro entre cuatro átomos) y no enlazantes (interacciones de puentes de hidrógeno, van der Waals y electrostáticas) son cruciales para la determinación de la estructura y dinámica del complejo ligando-receptor resultante ( Decherchi and Cavalli, 2020; Wang, 2021).

### **1.4.7 La disfunción del NMDAR y su posible intervención terapéutica**

Debido a la compleja implicación que tienen los NMDARs en gran variedad de procesos y funciones del cerebro humano, ha quedado patente en numerosos estudios como el mal funcionamiento (cambio actividad) o una expresión anormal de los NMDARs (alteración en la expresión, tráfico y localización de las diferentes subunidades) pueden jugar un papel determinante en la etiología de varios trastornos neuropsiquiátricos (Paoletti, Bellone and Zhou, 2013). Por ejemplo, la hiperfunción del NMDAR puede provocar excitotoxicidad y neurodegeneración, mientras que la hipofunción está relacionada con déficits cognitivos y se ha relacionado con trastornos del neurodesarrollo como las GRINpatias (debidas a alteraciones en los genes GRIN que codifican para las subunidades de los NMDARs), el autismo o la esquizofrenia (Seshadri *et al.*, 2018; Fedele *et al.*, 2018 ; kazu Nakazawa and Kiran Sapkota, 2020).

Una de las enfermedades más estudiadas relacionada con la hipofunción del NMDARs es la esquizofrenia, una enfermedad mental que afecta al 1% de la población mundial. Aunque su etiología es desconocida, la enfermedad ha sido extensamente caracterizada por anomalías neuromorfológicas y neuroquímicas, además de haberse relacionado con factores genéticos, ya sean solos o potenciados por factores ambientales y epigenéticos que juegan un papel importante en su patogénesis (Coyle, 2012). La hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia formulada en 1980, implica la disfunción del NMDAR como mecanismo subyacente que reproduce todos los síntomas de la enfermedad (Huang, Bo-Han He and Chen, 2017). Esta hipótesis derivó a partir de experimentos realizados con diversos compuestos antagonistas del NMDAR como la fenciclidina (PCP), la Ketamina y

el MK-801, los cuales reprodujeron los síntomas positivos, negativos y cognitivos de la esquizofrenia en personas sanas y los recrudecieron en personas esquizofrénicos (Angeles and Horn, 2014; Lahti et al, 2001).

A pesar de que se han desarrollado un gran número de fármacos con acción farmacológica dirigida a los NMDARs, y que han mostrado ser eficientes para el tratamiento de la hipofunción del NMDAR en modelos animales, la mayoría estos compuestos ha mostrado poca o limitada eficacia en humanos, y sus efectos adversos han sido clasificados como graves. Aun así, en este momento existen varios compuestos en fase clínica que actúan sobre la neurotransmisión glutamatérgica, y más concretamente sobre el sitio de unión de glicina en el receptor. De estas evidencias científicas, se ha derivado que la elevación de las concentraciones de glutamato o glicina, ya sea por la regulación de su transporte, o por la búsqueda de nuevos compuestos que ejerzan una modulación alostérica positiva de los NMDARs, podría, por lo tanto, presentar alternativas al tratamiento de esta enfermedad (Iwata *et al.*, 2015). Una estrategia muy prometedora para el desarrollo de nuevos compuestos con actividades potenciadoras de las respuestas agonistas del NMDAR, se basa en el diseño racional de péptidos a partir de las interacciones que se dan entre proteínas implicadas en el funcionamiento de este (Waqar and Batool, 2017). Los péptidos son reconocidos por ser altamente selectivos, eficaces y al mismo tiempo, relativamente seguros y bien tolerados (Fosgerau and Hoffmann, 2015 ; Bellows-Peterson *et al.*, 2012). En los últimos años ha aumentado el interés en la investigación y el desarrollo de péptidos; aproximadamente 140 péptidos terapéuticos están siendo evaluados en fases clínicas. Además, ya se están empezando a desarrollar péptidos multifuncionales que están siendo conjugados a fármacos o anticuerpos para aumentar su selectividad y eficiencia (Fosgerau and Hoffmann, 2015).

## 1.5 Péptido EAR-20

En el grupo de investigación de proteínas (GRIP) se diseñaron una serie de péptidos derivados de la Conantokina-G (Con-G), un antagonista de los NMDARs, cuya diana es extracelular (sitio de unión a ligando de GluN2B), como estrategia para regular la actividad de los NMDARs (Balsara *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2016). En total se diseñaron 5 péptidos, de los cuales se seleccionaron los péptidos EAR-16 y EAR-18 para ser sintetizados y evaluados electrofisiológicamente. El péptido EAR-20 fue propuesto como control negativo

o *scramble* en los ensayos funcionales, ya que éste corresponde a un péptido de 17 aminoácidos, que contiene el 90% de los aminoácidos de los péptidos EAR-16 y EAR-18, pero con la secuencia en orden aleatorio. En la evaluación funcional del péptido EAR-20 sobre neuronas hipocampales no se esperaba encontrar ningún efecto como sucede en este tipo de controles. Sin embargo, de manera sorprendente y en contraposición a los controles de los péptidos EAR-16 y EAR-18, se observó que EAR-20 presentaba actividad agonista evocando corrientes mediadas por los NMDARs en ausencia de glicina y glutamato (Reyes-Guzman *et al.*, 2017).

El propósito de esta tesis doctoral ha sido la evaluación funcional del péptido sintético EAR-20 mediante ensayos electrofisiológicos, donde se ha encontrado que EAR-20 presenta una pequeña actividad agonista sobre los NMDARs en ausencia de glicina y glutamato. Este resultado convierte a EAR-20 en un péptido muy interesante, ya que no existe en la literatura ningún compuesto que sea capaz de activar el canal del NMDAR en ausencia de glicina su coagonista principal, a pesar de que se ha demostrado que ciertos péptidos ( $\beta$ -amiloide) son capaces de activarlos en presencia de glicina (Alberdi *et al.*, 2010). También se ha determinado que el péptido EAR-20 potencia las respuestas agonistas en los NMDARs cuando es aplicado de manera simultánea con glicina y glutamato, lo que lo convierte en un compuesto con actividad PAM (*Positive allosteric modulator*). Según nuestros resultados experimentales, es posible que el péptido EAR-20 se esté uniendo a la interfase entre dominios LBD (*Ligand Binding Domain*) del heterotetrámero del NMDAR, ya que esta ha sido descrita como importante, porque la unión de compuestos en esta región es capaz de producir cambios conformacionales que modulan el *gating* en los NMDARs (Esmenjaud *et al.*, 2019a ; Bledsoe *et al.*, 2019). De acuerdo con lo anterior, nuestra hipótesis de trabajo fue que **el péptido EAR-20 puede modular la actividad de los receptores ionotrópicos de glutamato tipo NMDA**. Por lo que nos planteamos los siguientes objetivos para darle respuesta a esta hipótesis.

## 2. Objetivos

### Hipótesis

- El péptido EAR-20 puede modular la actividad de los receptores ionotrópicos de glutamato del tipo NMDA.

### 2.1 Objetivo general

- Evaluar estructural y funcionalmente el efecto del péptido sintético EAR-20 sobre los receptores de glutamato tipo NMDA.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar, purificar y caracterizar el péptido EAR-20.
2. Evaluar mediante ensayos electrofisiológicos la actividad del péptido EAR-20 en células HEK 293T transfectadas con el NMDAR y en neuronas hipocampales que expresan receptores NMDA endógenos.
3. Predecir *in silico* y validar *in vitro*, el posible sitio de unión del péptido EAR-20 sobre NMDAR.

## 3. Metodología

### 3.1 Síntesis, purificación y caracterización del péptido EAR-20

La síntesis del péptido EAR-20 se realizó en fase sólida SSPS . La síntesis de péptidos en fase sólida (**SPPS**, del inglés *solid-phase-peptide-synthesis*) fue descrita por Merrifield en 1963 (Merrifield, 1963), y es una metodología que permite obtener péptidos sintéticos de longitudes variable en un soporte sólido insoluble (resina). Esta estrategia química de síntesis se inicia con la reacción entre un carbono electro-deficiente del ácido carboxílico del aminoácido (a acoplar) activado en forma de éster (un buen grupo saliente), y el grupo amina primaria (un buen nucleófilo) del aminoácido que ha sido previamente acoplado a la resina. Esta reacción permite la formación de un enlace amida o peptídico. Es importante mencionar que, a diferencia de lo que ocurre en la síntesis de proteínas en los sistemas vivos, la SPPS se realiza desde el extremo C-terminal (COOH) al N-terminal (NH<sub>2</sub>) (Valeur and Bradley, 2009; D'Hondt *et al.*, 2014), por lo cual las secuencias de péptidos o fragmentos de proteínas objetivo se deben comenzar a sintetizar de derecha a izquierda, como se muestra en el siguiente esquema.

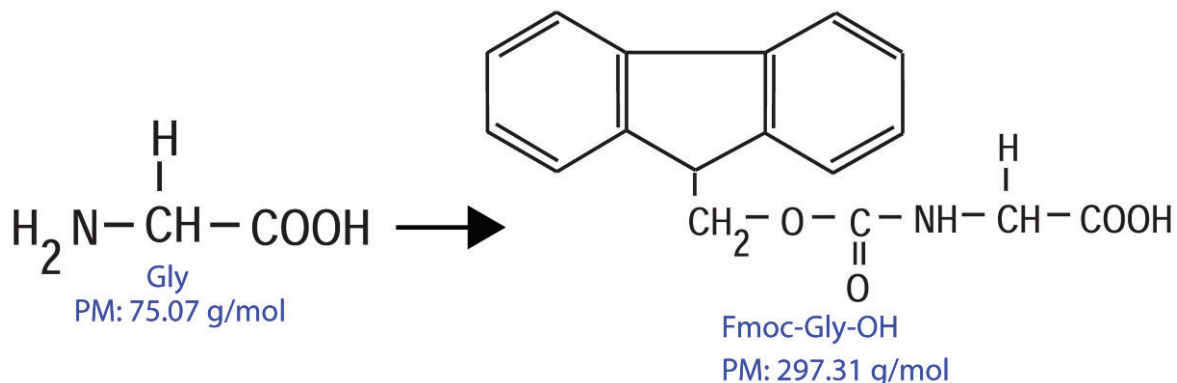
Orden Secuencia:	1	10	17
PÉPTIDO EAR-20:	<b>H<sub>2</sub>N-KLGMRSELQIDNDQDAD-COOH</b>		
Orden de Síntesis:	17	10	1

Los péptidos obtenidos mediante SPPS pueden ser purificados por extracción en fase sólida (**EFS-SPE**) o por cromatografía líquida de alta eficiencia (**HPLC**) en modalidad semipreparativa. Finalmente, estos péptidos se caracterizan mediante **HPLC** en modalidad analítica y espectrometría de masas (**EM-MALDI-TOF**), que permiten determinar la cantidad y la pureza de estas sustancias peptídicas. La estrategia SPPS que se presenta a continuación está basada en la química FMOC/ tBu, que emplea el grupo protector basicolábil 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (**Fmoc**) como grupo protector temporal del grupo α-

amino y los grupos tipo tert-butil (tBu) para proteger las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales (Jaradat, 2018).

### 3.1.1 Grupo Fmoc

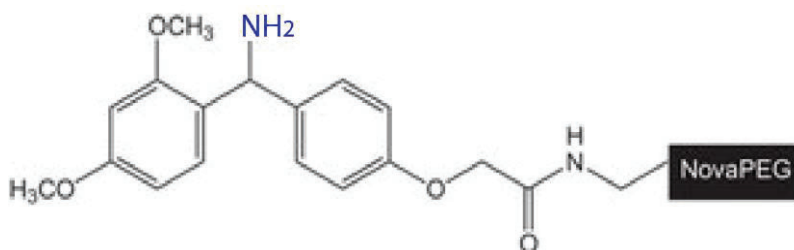
La investigación sobre nuevos grupos protectores para ser utilizados en SPPS permitieron la introducción del grupo Fmoc (Carpino and Han, 1970) como grupo protector de aminas con baja basicidad (Figura 3-1). Estos avances en SPPS utilizando el grupo Fmoc fueron acompañados por protección ortogonal, lo cual quiere decir que dos grupos funcionales de un aminoácido en particular pueden ser protegidos con dos grupos protectores diferentes, y más tarde durante la síntesis, un grupo protector puede ser selectivamente eliminado mientras que el otro grupo protector permanece intacto de manera que un grupo funcional permanecería protegido. Por esta razón, la estrategia de protección ortogonal permite la síntesis de gran variedad y cantidad de péptidos sintéticos. Esto contribuyó en gran medida a que el enfoque Fmoc / tBu, sea la estrategia más comúnmente utilizada en la actualidad para SPPS. Este procedimiento de síntesis se lleva a cabo en dos ciclos: 1) el ciclo de acople y 2) el ciclo de desacople o desprotección, cada uno monitoreados por la prueba de Ninhidrina o test de Kaiser (E. Kaiser et al. 1969).



**Figura 3-1:** Aminoácido Gly protegido en su grupo  $\alpha$ -amino con el Fmoc.

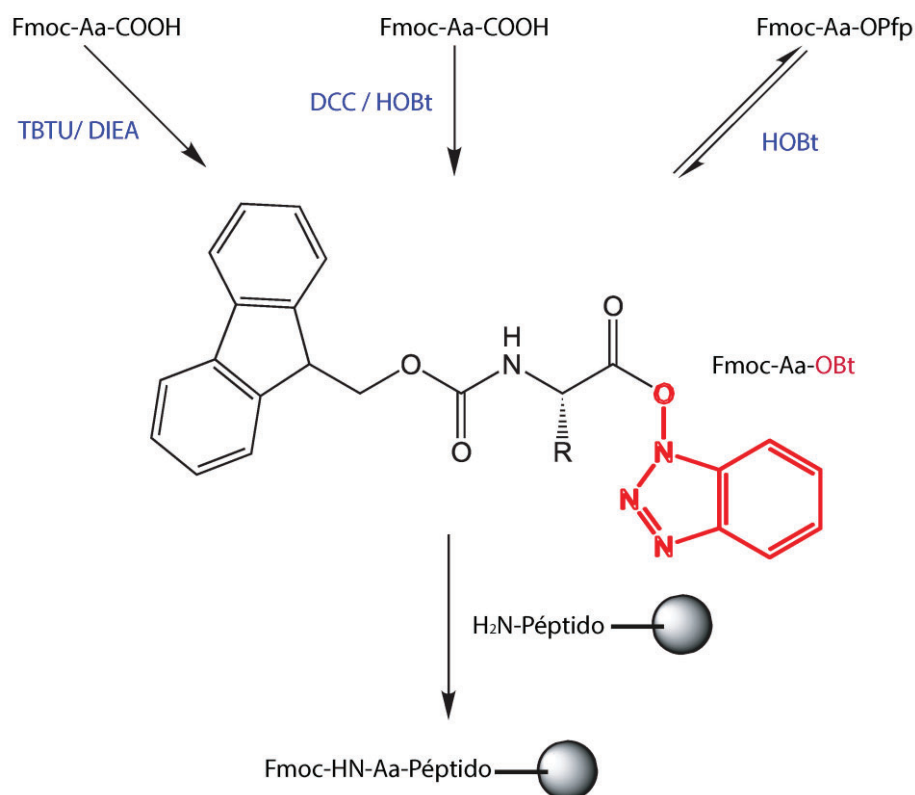
### 3.1.2 Ciclo de acople

En este ciclo se lleva a cabo la unión a la resina (figura 3-2) de cada uno de los aminoácidos que hacen parte de la secuencia del péptido que se quiere sintetizar.



**Figura 3-2:** Soporte sólido Resina NovaPEG Rink Amide. En azul se muestra el grupo nucleófilo (amina primaria) de la resina, donde se inmoviliza el primer aminoácido (amino Fmoc protegido) a través de su grupo COOH activado en forma de éster.

El ciclo de acople se inicia mediante la reacción entre el grupo amina ( $-NH_2$ ) de la resina o el grupo  $\alpha$ -amina del aminoácido desprotegido que ha sido previamente anclado a la resina, con el grupo COOH del aminoácido que se quiere acoplar, el cual previamente ha sido activado con un buen grupo saliente tipo éster (figura 3-3). Lo anterior, es importante para que se forme el enlace peptídico de manera más rápida y eficiente.

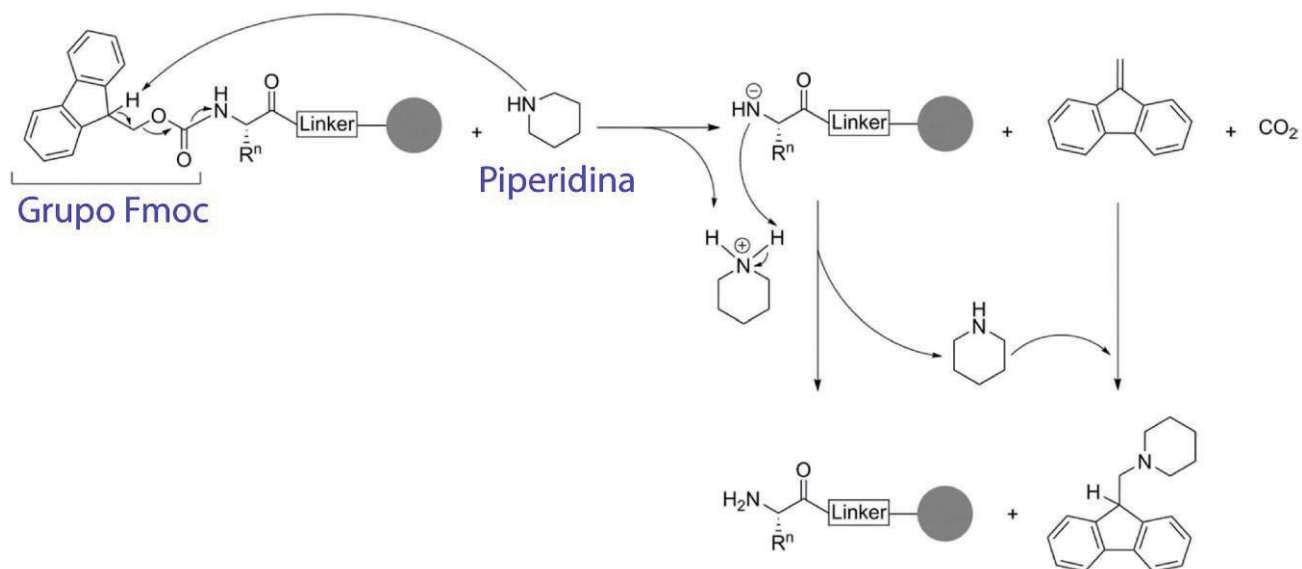


**Figura 3-3:** Rutas comunes para la formación del éster Bt (benzotriazolil), grupo activador del grupo COOH de los Fmoc aminoácidos. Tomado y modificado Novabiochem (Novabiochem, 2012).



### 3.1.3 Ciclo de desprotección o desacople

El objetivo de este ciclo de desprotección es quitar el Fmoc del grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) del péptido anclado a la resina, esto se logra con una solución de piperidina al 20% en DMF (Figura 3-4). Lo anterior, permite llevar a cabo un nuevo ciclo de acople con el siguiente aminoácido de la secuencia contribuyendo a la elongación del péptido. Después de cada uno de estos ciclos de desprotección se deben realizar un buen lavado del reactivo que se emplea durante esta etapa, ya que este puede desproteger el péptido incluso a concentraciones trazas, lo que generaría especies secundarias indeseadas en la síntesis que son de difíciles de eliminar en el proceso de la purificación (Jaradat, 2018).

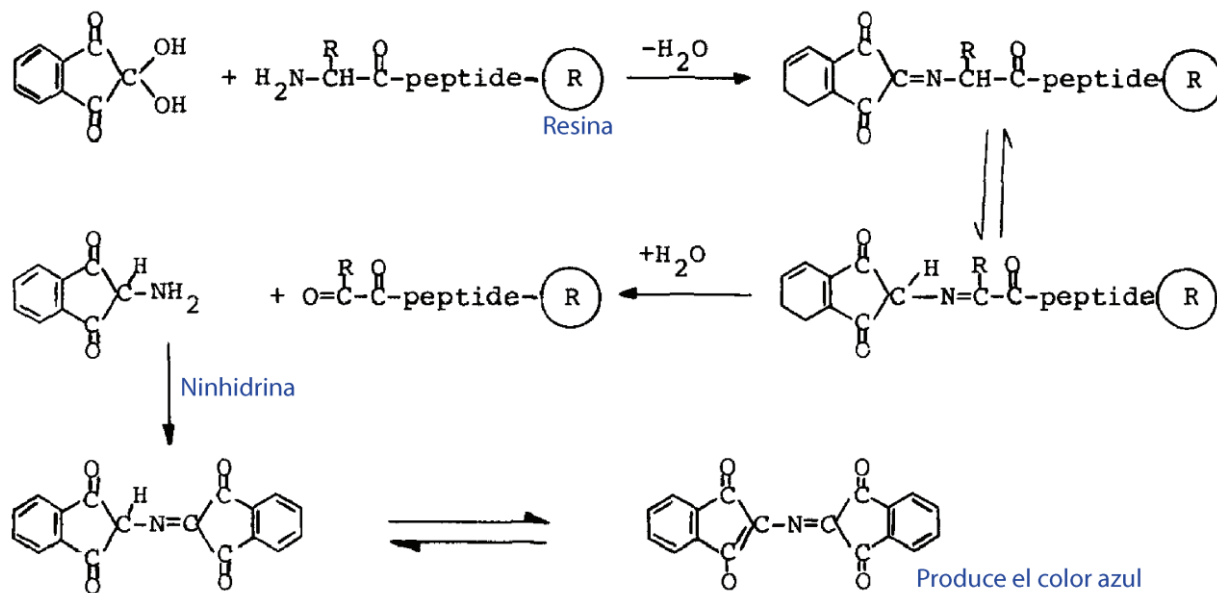


**Figura 3-4:** Remoción del grupo Fmoc 9-fluorenilmetoxicarbonil mediada por piperidina. Esta reacción permite la remoción del grupo Fmoc del último aminoácido que se ha acoplado a la resina, lo que facilita un nuevo ciclo de acople con el siguiente aminoácido de la secuencia del péptido a sintetizar. Tomado y modificado de Jaradat 2018 (Jaradat, 2018).

### 3.1.4 Prueba de Ninhidrinas o test de Kaiser

Gracias a esta prueba se puede realizar el seguimiento de la síntesis química de péptidos, debido a que esta permite controlar las reacciones de acople y desprotección, ya que con este ensayo se logran identificar grupos de aminas primarias desprotegidas (en acople o

en desprotección), debido al desarrollo de un color azul en la solución y/o en la resina (figura 3-5).



**Figura 3-5:** Reacción general de ninhidrina con una amina primaria. Este paso es muy importante en la síntesis de péptidos ya que permite monitorear los ciclos de acople y desprotección. Tomado y modificado Sarin *et al.* 1981 (Sarin *et al.*, 1981).

### 3.1.5 Síntesis del péptido EAR- 20

Esta síntesis se realizó en fase sólida SSPS, utilizando para ello los aminoácidos protegidos en su grupo  $\alpha$ -amino con el grupo protector básico lábil Fmoc (Atherton *et al.* 1981; Behrendt, White and Offer, 2016) y según el caso, también protegida la cadena radical reactiva con otros grupos protectores como se muestra a continuación:

- Fmoc-ASP (OtBu)-OH
- Fmoc-Ala-OH
- Fmoc-Gln (Trt)-OH
- Fmoc-Asn (Trt)-OH
- Fmoc-Ile-OH
- Fmoc-Leu-OH
- Fmoc-Glu (OtBu)-OH
- Fmoc-Ser(tBu)-OH
- Fmoc-Arg (Pbf)-OH

- Fmoc-Met-OH
- Fmoc-Gly-OH
- Fmoc-Lys (Boc)-OH

La síntesis del péptido se llevó a cabo en el laboratorio del grupo de investigación en proteínas (GRIP), de la Universidad Nacional de Colombia. Se pesó aproximadamente 200 mg de resina NovaPEG Rink Amide (0.49 mmol/g, Merck, Alemania), y se hinchó con 2mL de diclorometano (DCM, Merck, Alemania) durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se verificó que la resina no estuviera protegida en su grupo amino (sitio activo) mediante el test de Kaiser (NN)(E. Kaiser et al. 1969, 1969; Sarin *et al.*, 1981). Todas las reacciones de acople y desprotección fueron monitorizadas mediante la prueba de Kaiser, con la cual se logró identificar la presencia de grupos aminos primarios desprotegidos al desarrollarse color en la solución (tonalidad de azul) y/o en la resina (azul o rojo). La mezcla de reacción en el reactor estaba constituida por resina, una cantidad cinco veces superior a la necesaria del aminoácido Fmoc requerido, y un exceso de cinco veces del activador a utilizar de acuerdo con la estrategia de acople seleccionada. La mezcla anterior fue disuelta en 2mL del solvente N, N-dimetilformamida (DMF, Merck, Alemania). Finalmente, el reactor se sometió a agitación suave durante 3 horas, y tras este período de tiempo se determinó la eficiencia del acople mediante el test Kaiser.

Las estrategias de acople que se utilizaron fueron las siguientes (a) TBTU+DIEA, (b) DCC+ Oxyma y (c) DCC, y se modificaron en los casos en que la reacción no fue completa (test de Kaiser positivo) en el siguiente orden: (1) TBTU + DIEA, (2) DCC + Oxyma y (3) DCC. Se empleó la síntesis asistida por microondas cuando los aminoácidos a acoplar eran diferentes a aspartato, glutamato y arginina, ya que estos aminoácidos producen reacciones colaterales no deseadas. Tampoco se utilizó microondas cuando se utilizó la estrategia (c) DCC, debida a su alta reactividad, y posibilidad de formación de productos de racemización. Se emplearon lavados alternos de DCM (3 x 1mL) e IPA (2 x 1mL) entre los ciclos de acople y test de Kaiser, con el objetivo de eliminar los reactivos en exceso. En los ciclos de desprotección se garantizó la liberación del grupo Fmoc, sometiendo la resina con el péptido elongado a reacción con una solución de piperidina al 20% en DMF (2 x 2mL), durante 30 minutos. Entre los ciclos de desprotección, y test de Kaiser se eliminó la mezcla de reacción con lavados exhaustivos con DCM (5 x 1mL), IPA (3 x1 mL) y

nuevamente DCM (2 x 1mL), para asegurar la remoción del excedente de la base piperidina y evitar reacciones colaterales. En la figura 3-6 se muestra el flujo de la síntesis de EAR-20 de una forma general.

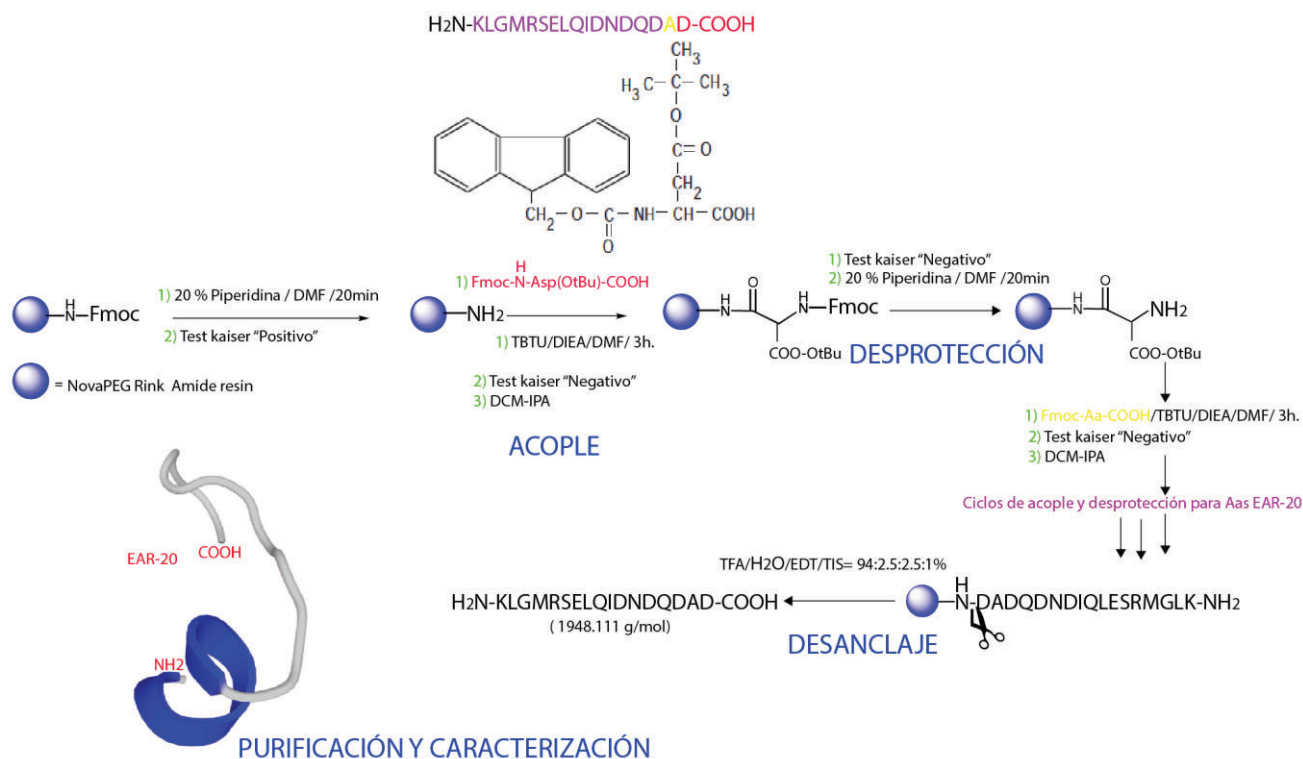
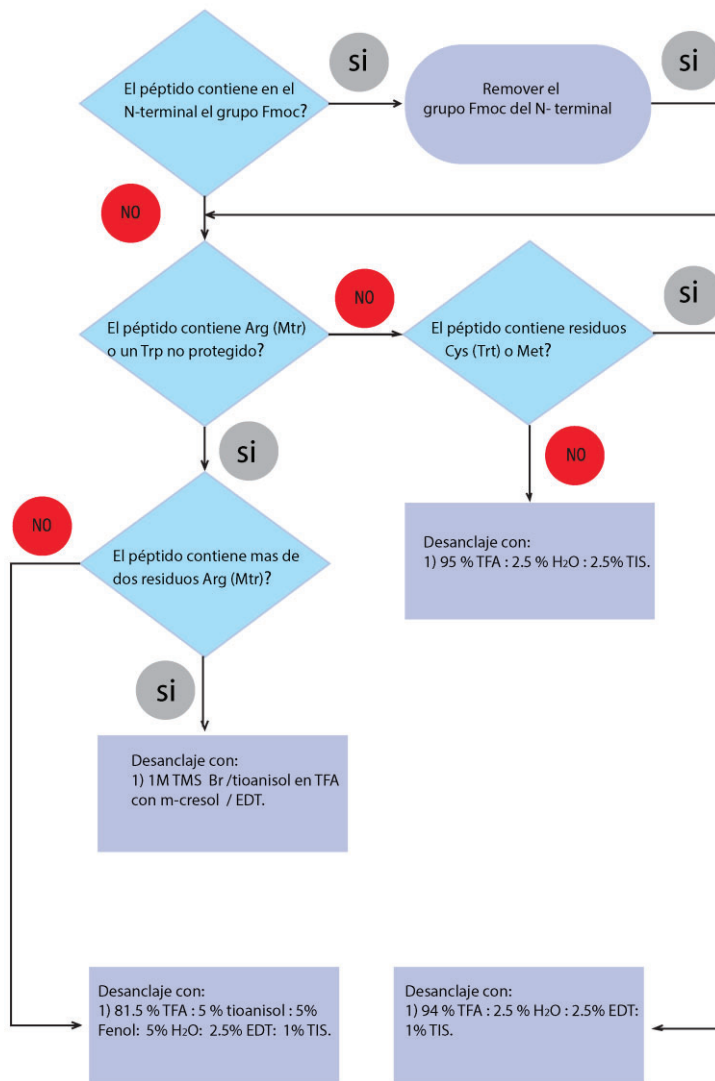


Figura 3-6: Procedimiento general empleado para la síntesis del péptido EAR-20.

### 3.1.5.1 Desanclaje del péptido EAR- 20

Al finalizar la síntesis, se separó el péptido de la resina utilizando 20mL de coctel de desanclaje por cada gramo de resina-péptido, el cual estaba compuesto por ácido trifluoroacético (TFA, Sigma, Usa) y reactivos que recolectaban carbocationes, conocidos como *scavengers*, en proporciones definidas de etanoditiol (EDT, Merck, Alemania), triisopropilsilano (TIS, Merck, Alemania) y agua tipo HPLC (94:2.5:1:2.5%); este coctel de desanclaje se seleccionó siguiendo el diagrama de flujo de la figura 3-7. Transcurridas 3 horas de reacción, el sobrenadante se separó de la resina por filtración y se transfirió a un tubo de centrifuga de 50mL junto con lavados de TFA realizados a la resina (2 x 2mL). A esta solución se le adicionó éter frío hasta completar 30mL, luego se enfrió en nevera a -20°C por 5 minutos y se separó por centrifugación (5000rpm, 10 minutos) el sobrenadante

del precipitado. El precipitado (contenía el péptido EAR-20) se lavó por triplicado con éter frío, realizando el mismo procedimiento mencionado anteriormente, el cual permitió eliminar los restos de *scavengers*. Finalmente, se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente con el objetivo de eliminar por evaporación el éter y así de esta manera obtener el péptido EAR-20 sólido.



**Figura 3-7:** Diagrama de flujo para determinar cóctel de desanclaje para Fmoc-SPPS. Tomado y modificado de Novabiochem *Fmoc resin cleavage protocols* (Novabiochem, 2012).

### 3.1.5.2 Caracterización y Purificación de EAR-20

El péptido EAR-20 se caracterizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en modo analítico, empleando el equipo MERCK-HITACHI con detector 5410 UV-Vis a  $\lambda = 210$  nm, bomba 5160 y columna RP18e (Chromolith) en un gradiente de 0-70% de acetonitrilo con TFA 0.05% durante 45 minutos a un flujo de 1 mL/min, esto se realizó con el objeto de determinar el número de especies obtenidas en la síntesis (muestra para análisis: 0.2 mg/mL en agua-TFA 0.05%).

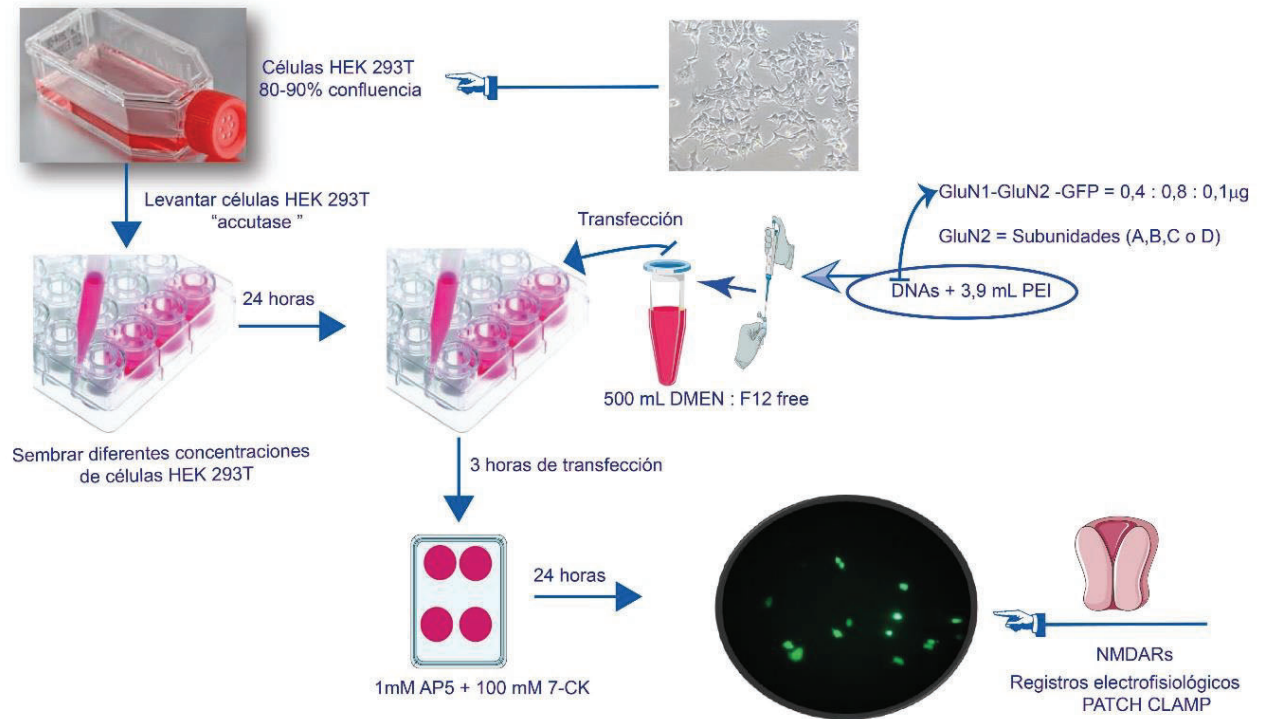
Una vez caracterizados los picos cromatográficos por espectrometría de masas MALDI-TOF empleando como matriz el HCCA, se determinó cual correspondía al EAR-20, y se procedió a purificar el péptido por cromatografía HPLC modo semi-preparativa, empleando el equipo MERCK-HITACHI con detector 5410 UV-Vis a  $\lambda = 210$  nm, bomba 5160 y columna RP18e (Chromolith semiprep 100, 10  $\mu$ m), utilizando para ello el porcentaje de ACN en el que se obtuvo el péptido, y se modificó el programa a 60 minutos con un gradiente de ACN-agua entre el porcentaje analítico  $\pm 10\%$  ACN, es decir, a  $t_0 = \%ACN - 10$  y a  $t_{60} = \%ACN + 10$  ( $\Delta = 0.33\%ACN/min$ ), con un flujo de 2.5 mL/min. Finalmente se recolectó la fracción de interés donde eluía el péptido EAR-20, se eliminó el ACN en un rotavapor, se congeló y liofilizó, obteniéndose de esta manera el péptido puro para los ensayos electrofisiológicos.

### **3.2 Registros electrofisiológicos en células HEK 293T transfectadas y neuronas hipocampales**

Para llevar a cabo los registros electrofisiológicos con EAR-20, primero se realizó la transfección de células HEK 293T (células embrionarias de riñón humano) con diferentes subunidades recombinantes del NMDAR (GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C y GluN2D). Los plásmidos de rata para la expresión de GluN1, GFP-GluN2A y GFP-GluN2B fueron amablemente proporcionados por el Dr. Vicini (Centro Médico de la Universidad de Georgetown, Washington, Estados Unidos). Los plásmidos de rata para la expresión de GluN2C y GluN2D fueron amablemente proporcionados por el Dr. Jon W. Johnson (Departamento de Neurociencias Universidad de Pittsburgh, Estados Unidos). Los plásmidos de rata GluN1-6A, GluN2A- r1 y GluN2B- r2, para la expresión exclusiva de los tri-heteroméros GluN1-GluN2A-GluN2B fueron amablemente proporcionados por el Dr. Pierre Paoletti (Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (IBENS), París, Francia).

Las células HEK 293T se diferencian de las HEK 293 tradicionales en que contienen el antígeno-T de SV40 (virus de simio), que permite la replicación episomal de plásmidos que contienen el origen de replicación SV40, gracias a lo que se consigue una mayor amplificación de los plásmidos transfectados y una expresión por más tiempo (Venkatachalan *et al.*, 2007). Con el objetivo de estandarizar el proceso de transfección de los NMDARs en células HEK 293T, se evaluaron dos sistemas de transfección Polietilenimina (PEI) y Xtreme GENE 9. Con base en estos resultados de estandarización, se realizó la transfección de las células HEK 293T utilizando una cantidad total de DNA de 1,3 µg, en una relación de 1:2:0,25 (0,4 µg GluN1 : 0,8 µg GluN2: 0,1 µg GFP) y 3,9 µL (en una relación 3:1 PEI : DNA) de PEI en medio DMEM-F12 free. Tras tres horas de transfección se levantaron (disociaron) las células con ayuda de la solución Accutase® (mezcla de enzimas proteolíticas y colagenolíticas), y se sembraron a diferentes densidades en pozos que contenían cubres con poli-D-lisina y medio DMEM-F12 suplementado en presencia de los antagonistas de los NMDARs AP-5 (ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico; 1 mM) y 7-CK (ácido 7-clorokinurénico; 125 µM), para prevenir la excitotoxicidad mediada por los NMDARs (figura 3-8).





**Figura 3-8:** Procedimiento general para la transfección de células HEK 293T con las diferentes subunidades del NMDAR.

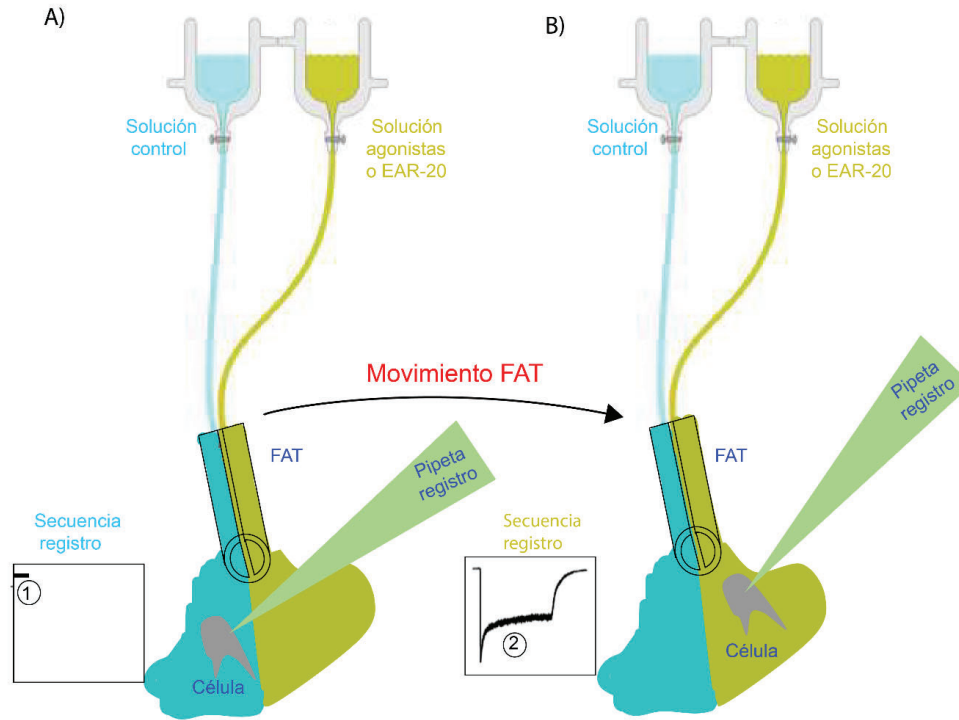
Tras 24 horas de la transfección se realizaron registros electrofisiológicos en la configuración *whole cell* sobre las células GFP positivas. Estos registros electrofisiológicos (de las corrientes evocadas por Glu/Gly mediadas por el NMDAR) se realizaron en el laboratorio de neurofisiología de la Universidad de Barcelona, utilizando para este propósito un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Unión City, CA) y el programa de registro Clampfit 10.4 (Axon Instruments, Unión City, CA). Los cubreobjetos o laminillas con las células transfectadas se colocaron en la cámara de perfusión con solución extracelular (solución de baño) la cual contenía; 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes y 10 mM D-glucosa, ajustada a pH 7.4 con una solución de NaOH 5M. El ion magnesio fue omitido para prevenir el bloqueo voltaje dependiente del canal de los NMDARs. La solución intracelular (solución de llenado de micropipetas) estaba compuesta por; 140 mM CsCl, 10 mM Hepes, 5 mM EGTA, 4 mM Na<sub>2</sub>ATP y 0.1 mM Na<sub>3</sub>GTP, ajustada a pH 7.25 con CsOH 1M. Las micropipetas utilizadas para realizar los registros electrofisiológicos fueron de borosilicato y tenían resistencias de 2-3 MΩ tras ser estiradas con un estirador de pipetas o "puller" (Sutter instrument Co, Modelo p-97) y pulidas mediante una forja MF-830 (Narishige, Japan).

Para llevar a cabo los registros electrofisiológicos en la configuración de *whole cell*, primero se obtuvo la configuración de *cell attached*. Para ello, inicialmente se mantuvo una presión positiva en el interior de la micropipeta mientras se realizaba la aproximación de esta sobre la célula GFP positiva con ayuda de un micromanipulador (Scientifica, UK). Cuando la pipeta hizo contacto con la membrana de la célula, se aplicó una succión negativa para provocar que parte de la membrana se introdujera dentro de la micropipeta, lo cual resultó en una fuerte unión entre la membrana y el vidrio, que generaría el sello del orden de los Gigaohms ( $>1\text{G}\Omega$ ). Tras la obtención de este sello de alta resistencia, se fijó el potencial de membrana a  $-60\text{ mV}$  (*Voltage clamp*), y se efectuó la ruptura de la membrana mediante la aplicación de una suave succión con ayuda de una jeringa. Lo anterior, se realizó con el propósito de generar contacto eléctrico entre la solución de registro ubicada en el interior de la micropipeta y el citoplasma de la célula. Para producir las respuestas de los NMDARs, estos se estimularon durante 5 segundos con  $1\text{mM}$  de Glu y  $50\text{ }\mu\text{M}$  de Gly (control de la magnitud de corriente), y tras un tiempo de lavado de agonistas, se aplicó el péptido EAR-20 mediante los sistemas de perfusión *fast application tool* (FAT) o micro-inyección con el IM 300 (NARISHIGE) según las condiciones de experimentación.

### **3.2.1 Sistema de perfusión rápida; *FAST APPLICATION TOOL* (FAT)**

El FAT fue uno de los sistemas de perfusión utilizados para realizar la aplicación de agonistas o EAR-20 durante los ensayos electrofisiológicos. Este sistema es muy utilizado en los laboratorios de electrofisiología por su versatilidad, precisión y reproducibilidad en los resultados (Coombs and Soto, 2016). Consta de un vidrio de borosilicato con un septum en medio ( en forma de  $\Theta$ , de OD:  $1.5\text{ mm}$  y  $10\text{ cm}$  de largo) el cual es sometido a un estiramiento mediante un *puller* vertical y luego es cortado cuidadosamente con la punta de un diamante. Finalmente, al FAT se le adaptan dos tubos de polietileno donde se conectan las soluciones de control (solución extracelular diluida un 2% con agua destilada) y agonistas (Glu y Gly o EAR-20) (figura 3-9). El rápido movimiento del FAT para aplicar sobre la célula de interés la solución control (figura 3-9A) o la solución de agonistas (figura 3-9B) es controlado por un sistema piezoeléctrico de gran precisión. Con este sistema de

perfusión se realizaron los primeros ensayos electrofisiológicos en caminados a la evaluación de EAR-20.

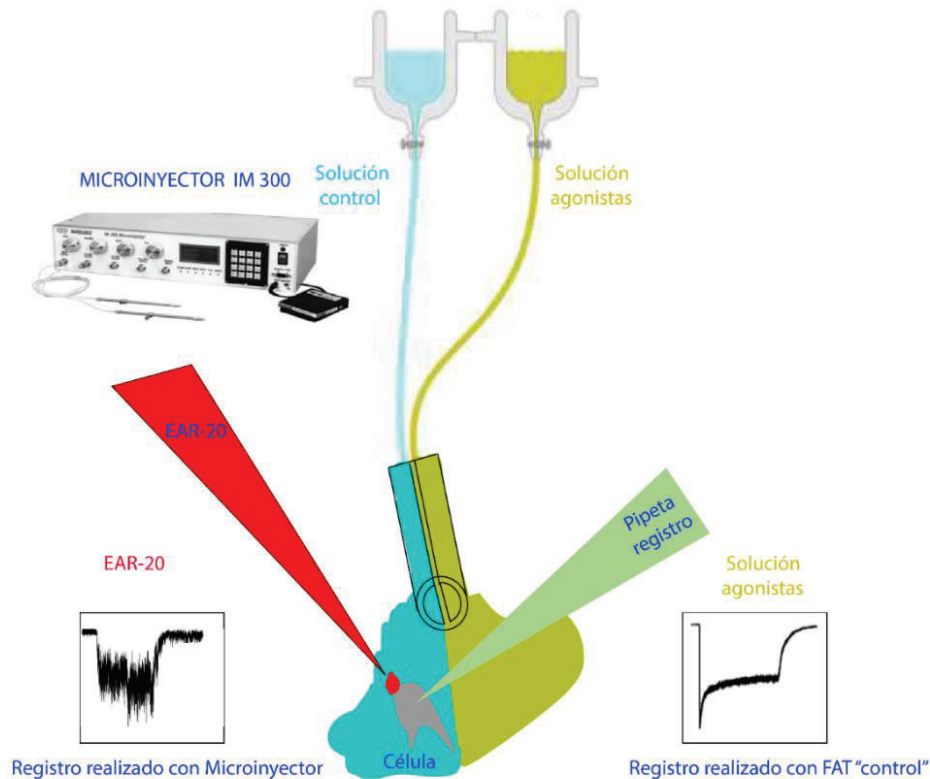


**Figura 3-9:** Esquema secuencial de un registro electrofisiológico mediante la implementación del sistema de perfusión FAT. **A)** La célula que está siendo registrada está bañada por la solución control que no contiene agonista (solución turquesa), por ello no se observa corriente en posición 1. **B)** El FAT es movido rápidamente por el dispositivo piezoeléctrico desde la solución control hasta la solución con agonistas (solución pistacho), produciendo que los NMDARs expresados en la célula se activen y generen corriente en la posición 2.

### 3.2.2 Sistema de perfusión FAT y microinyección (IM 300 NARISHIGE)

Debido a que en los ensayos electrofisiológicos con EAR-20 utilizando el sistema de perfusión FAT conllevaba la utilización de una gran cantidad de péptido, fue necesario la búsqueda y estandarización de un nuevo sistema de perfusión para la aplicación de concentraciones más altas de EAR-20 debido a la escasez del péptido por la dificultad que representa obtener grandes cantidades de EAR-20 por síntesis química. El sistema elegido para ser evaluado fue la microinyección mediante el equipo IM 300 NARISHIGE. Este sistema consta de una micropipeta que aplica agonistas o EAR-20 sobre la célula que se

quiere registrar. Lo anterior, se logra mediante un flujo de nitrógeno que viaja por un tubo hasta la micropipeta de aplicación, la cual dosifica una cantidad específica de solución de agonistas o EAR-20, como resultado de la presión y tiempo de flujo de nitrógeno que se programa previamente (figura 3-10).



**Figura 3-10:** Esquema general de los dos sistemas de perfusión utilizados para la evaluación funcional de EAR-20. La aplicación de EAR-20 se realizó mediante el microinyector, y la de agonistas mediante el FAT, de esta manera se logró contar con un control de la corriente evocada por el NMDAR en condiciones donde solo se aplicó agonistas.

### 3.2.3 Registros electrofisiológicos en cultivos primarios de neuronas hipocampales

Los cultivos primarios de neuronas hipocampales se prepararon a partir de ratones neonatos (C57BL/6J). Todos los animales fueron usados de acuerdo con los lineamientos del comité de ética de la Universidad de Barcelona. La extracción y cultivo de neuronas se basó en el procedimiento reportado por Ian D. Coombs y David Soto en 2016 (Coombs and Soto, 2016).

### 3.2.3.1 Extracción de hipocampos

Los ratones fueron anestesiados y decapitados. A continuación, con ayuda de unas pinzas se retiró la piel que recubría el cráneo, y se extrajo el conjunto cerebro-cerebelo. Cuidadosamente se removió el cerebelo y se colectaron en promedio 4 o 5 cerebros en medio de disección frío (HBSS, 1X, sin calcio y magnesio). Posteriormente, se separaron los hemisferios cerebrales y se retiraron las meninges. Una vez retiradas las meninges se pudo apreciar el hipocampo. Usando las pinzas se removieron con mucho cuidado los hipocampos de cada hemisferio y se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL que contenía 2 mL de medio de disección frío, y se realizaron dos lavados con 2 mL de medio de disección frío.

### 3.2.3.2 Disociación y cultivo de neuronas hipocampales

Para la disociación del tejido, se adicionaron 300  $\mu$ L de tripsina al 0.25% (Gibco) al Falcon con los 2 mL de medio de disección que contenía los hipocampos, y luego se transfirió a la incubadora a 37°C durante 20 minutos con rotación constante. Pasado este tiempo se procedió a la inhibición de la tripsina mediante la adición de 5 mL de medio neurobasal completo suplementado con suero fetal bobino, antibióticos (penicilina y estreptomycin), L-glutamina y glucosa. Después se descartó la solución anterior y se realizaron dos lavados, el primero con 5 mL y luego con 10 mL de medio neurobasal completo. Los hipocampos se disociaron mecánicamente en este volumen final, usando pipetas Pasteur de vidrio cuyas puntas fueron previamente pulidas con calor para tener 3 calibres diferentes (grande, mediana y pequeña). La disociación consistió en pasar 10 veces los hipocampos por cada punta de la pipeta pasteur, usando primero la de punta grande, luego la mediana y finalmente la punta pequeña, hasta que se obtuvo una suspensión celular. Esta suspensión celular se pasó por un filtro (Cell Strainer, 70 $\mu$ M, BD Falcon) con el objetivo de separar el tejido no disociado. Finalmente se realizó el conteo celular y se determinó la viabilidad celular usando el método de azul de tripano en un hemocitómetro o cámara de Neubauer. Las células se sembraron a una densidad de 60.000-80.000 células por pozo sobre cubreobjetos circulares de 12 mm para los posteriores experimentos de electrofisiología, las cuales contaban con un previo recubrimiento de una mezcla de Poli-D-lisina (37.5  $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich) y Laminina (2.5  $\mu$ g/ml, Invitrogen), y habían sido colocadas en placas de 24 pozos.

Los cultivos de neuronas hipocampales se mantuvieron a 37°C, 95% de humedad, 5% de CO<sub>2</sub>. Cada 5 o 6 días se realizaron cambios de la mitad del medio neurobasal suplementado.

### **3.2.3.3 Registros electrofisiológicos de neuronas hipocampales**

Los registros electrofisiológicos de neuronas hipocampales se realizaron entre los DIV 14 y 21, usando la metodología de *patch-clamp* en la configuración *whole cell*. En los registros electrofisiológicos con el péptido EAR-20, se omitió el ion magnesio para evitar el bloqueo del canal NMDAR; a la solución extracelular se le adicionó: 1 μM tetrodotoxina para bloquear la actividad de canales de sodio voltaje dependientes y así bloquear potenciales de acción y por lo tanto la actividad sináptica no deseada, 20 μM CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) para bloquear la actividad de los receptores glutamatérgicos AMPA y Kainato, y 100 μM picrotoxina para eliminar las corrientes inhibitorias de los receptores GABA<sub>A</sub>. Además, para evitar la activación simultanea de otros receptores metabotrópicos de glutamato, las neuronas se estimularon con 100 μM NMDA, un agonista selectivo no fisiológico de los NMDARs.

## **3.3 Predicción *in silico* y validación *in vitro*, del posible sitio de unión del péptido EAR-20 sobre el NMDAR**

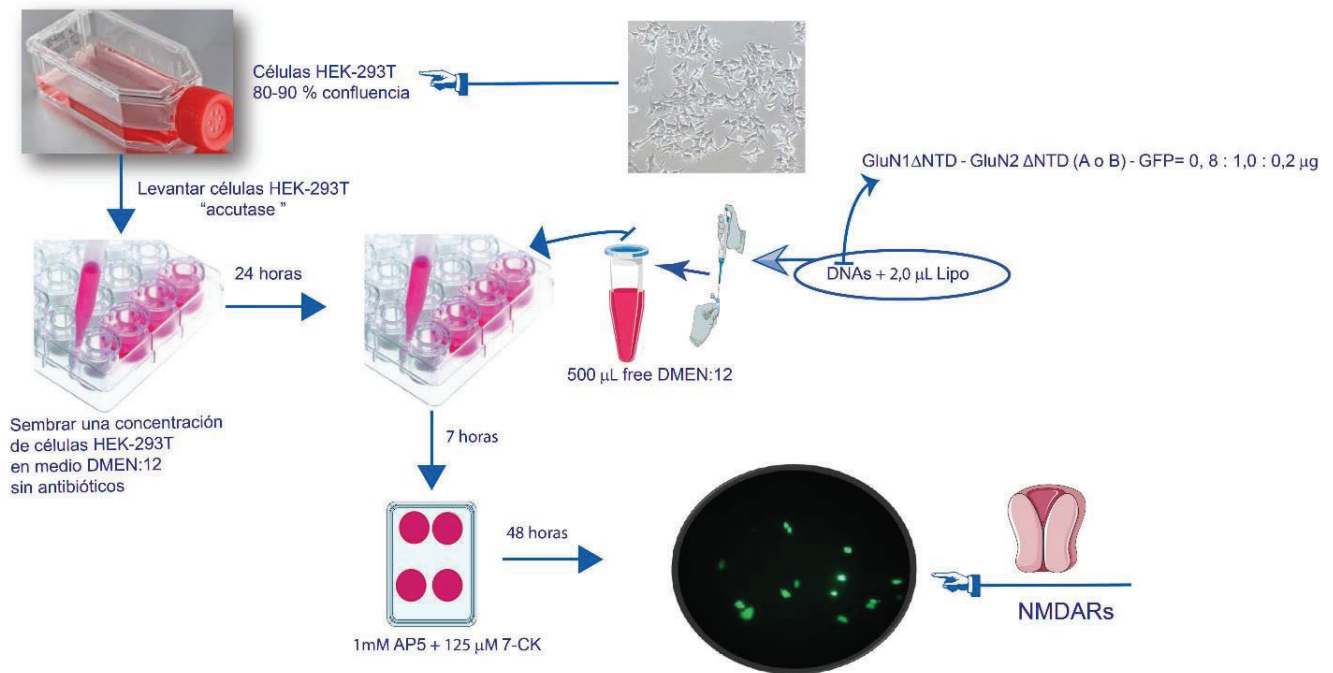
Con el objetivo de disminuir el gasto computacional en los estudios *in silico*, se realizaron registros electrofisiológicos de *patch-clamp* en células HEK 293T transfectadas con NMDARs desprovistos de los ATDs (GluN1-GluN2A ΔATD y GluN1-GluN2B ΔATD).

### **3.3.1 Ensayos electrofisiológicos sobre NMDARs con el ATD delecionado**

Para llevar a cabo los registros electrofisiológicos con EAR-20 sobre los NMDARs desprovistos de los ATDs, primero se transfectaron células HEK 293T con los plásmidos pGEMHE NR1-1a ΔATD (GluN1a<sup>ΔATD</sup>), pRK5 NR2A ΔATD (GluN2A<sup>ΔATD</sup>) y pRK5 NR2B ΔATD (GluN2B<sup>ΔATD</sup>) que contenían la información genética para la expresión de las subunidades del NMDAR con las respectivas deleciones de los ATDs (plásmidos

amablemente facilitados por el Dr. Pierre Paoletti de la Ecole Normale Supérieure de París) (Rachline, 2005). Los ATDs de las subunidades del NMDAR han sido descritos como importantes en el ensamble y tráfico del tetrámero hacia la membrana de las células HEK 293T y oocitos (Qiu *et al.*, 2009; Horak *et al.*, 2014) y, en concordancia con este hecho, se tuvieron muchos problemas para la obtención de corrientes de una magnitud similar a las mostradas por las formas completas del NMDAR. Por este motivo se tuvieron que ensayar una gran variedad de métodos de transfección, y, por lo tanto, se invirtió mucho tiempo haciendo ensayos de *patch-clamp* para obtener las mejores condiciones de transfección que nos permitiera conseguir registros electrofisiológicos con valores de corriente cuantificables y reproducibles. Como resultado de estos ensayos, se decidió cambiar el PEI (el método de transfección utilizado) por Lipofectamina 2000 y se incrementó la concentración de DNA total a 2 µg, en una relación de GluN1<sup>ΔATD</sup> / GluN2A<sup>ΔATD</sup> / GFP 0.8 : 1 : 0.2 o GluN1<sup>ΔATD</sup> / GluN2B<sup>ΔATD</sup> / GFP 0.8 : 1 : 0.2. Asimismo, también se incrementó el tiempo de transfección a 7 horas previo al levantamiento y siembra de las células a diferentes densidades en pozos que contenían cubres tratados con poli-D-lisina, en presencia de los antagonistas de los NMDARs AP-5 (1mM) y 7-CK (125 µM). Finalmente, después de 48 horas de expresión de las células se realizaron registros electrofisiológicos *de patch-clamp* en la configuración *Whole Cell* (figura 3-11). A pesar de que se obtuvieron corrientes considerables en receptores GluN1-GluN2A<sup>ΔATD</sup> y GluN1-GluN2B<sup>ΔATD</sup> siguiendo esta metodología, no fue posible encontrar respuestas electrofisiológicas significativas sobre las células transfectadas con las dos subunidades desprovistas de los ATDs (GluN1<sup>ΔATD</sup> y GluN2<sup>ΔATD</sup>).





**Figura 3-11:** Procedimiento general para la transfección de células HEK 293T con las subunidades del NMDAR que carecían de los ATDs.

### 3.3.2 Ensayos de *docking* molecular entre el EAR-20 y el NMDAR

Tras confirmar que la actividad PAM del péptido EAR-20 no dependía de la presencia de los ATDs, y por lo tanto que la unión del péptido EAR-20 posiblemente no se producía sobre esta región, se decidió comenzar con los estudios *in silico* a través de un *docking* molecular entre el péptido EAR-20 y el NMDAR, enfocándonos principalmente sobre los dominios LBDs del di-heterómero GluN1a-GluN2B, como se detalla a continuación :

#### 3.3.2.1 Selección de la estructura del NMDAR en “PDB” y modelamiento estructural del péptido EAR-20

1. Se seleccionó la estructura cristalográfica del NMDAR (GluN1a-GluN2B, Código PDB 4PE5) (Karakas and Furukawa, 2014) para *rattus norvegicus* del Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/> ; RCSB PDB: Homepage) .

2. El modelamiento estructural del péptido EAR-20 (ligando) se realizó usando tres diferentes herramientas bioinformáticas; a) pep-fold 3 (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>) (Lamiable *et al.*, 2016), b) I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (*I-TASSER server for protein structure and function prediction*) y c) Modeller localizada en MPI Bioinformatics ToolKit (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/#/tools/modeller>) (*MODELLER Bioinformatics Toolkit*). A pesar de que cada una de las herramientas bioinformáticas utilizadas cuentan con algoritmos para evaluar la calidad de la predicción, el mejor modelo predicho (mejor *score*) por cada programa, fue reevaluado y refinado mediante el diagrama de Ramachandran (Wiederstein and Sippl, 2007).

### 3.3.2.2 Simulación de acoplamiento molecular “*Docking*”

1. La preparación de las diferentes estructuras del receptor y ligando se llevaron a cabo utilizando las herramientas bioinformáticas AutoDock vina (Trott and Olson, 2009) y el visualizador PyMOL (<https://pymol.org/2/>; *pymol.org*). La preparación de las estructuras consistió en la eliminación de las moléculas de agua, iones y cofactores, así como la asignación de átomos de hidrógeno y cargas formales. El tratamiento del ligando (EAR-20) se basó en la revisión de las posiciones de sus átomos y de todos sus enlaces.
2. El acoplamiento molecular se realizó utilizando libre rotación de todos los enlaces del ligando EAR-20, y se dirigió hacia el NMDAR completo (GluN1a-GluN2B). De esta manera se identificaron los posibles sitios de unión del péptido EAR-20 sobre el NMDAR (las interacciones entre EAR-20 y NMDAR que reportaron los valores de energía más bajos).
3. En todos los casos las dimensiones y coordenadas de la caja de cribado (Grid Box) o espacio de trabajo para buscar la mejor interacción del péptido EAR-20 con el NMDAR fue X=126, Y= 126 y Z=114 puntos, y el espaciado del Grid Box fue de 0.375Å, la exhaustividad y el número de resultados por acoplamiento fue de 9. Todos los resultados obtenidos fueron analizados manualmente mediante

Discovery Studio Visualizer version 2020 (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer>; *BIOVIA Discovery Studio Visualizer - Dassault Systèmes*).

### 3.3.3 Validación del potencial sitio de unión de EAR-20

Con el doble propósito de indagar sobre el posible sitio de unión del péptido EAR-20 sobre el NMDAR, y determinar el posible efecto terapéutico de EAR-20 sobre patologías que involucran la hipofunción del NMDAR, se realizaron mutaciones de residuos específicos. En primer lugar, se realizó la mutación de un residuo del di-heterómeros GluN1(S773A)-GluN2B que según los estudios de docking puede ser un punto de interacción importante para la unión de EAR-20. En segundo término se mutaron residuos presentes en pacientes con GRINpatias, las cuales provocan, acorde con estudios previos, la hipofunción del NMDAR (Soto *et al.*, 2019). Para ello se realizó mutagénesis dirigida de los residuos que producen esta hipofunción sobre los di-heterómeros del NMDAR ensamblados con GluN1-GluN2A ( V820I y R692G ) o GluN1-GluN2B (P553T) (Swanger *et al.*, 2016; Elmasri *et al.*, 2022; Fedele *et al.*, 2018).

#### 3.3.3.1 Registros electrofisiológicos con EAR-20 sobre NMDARs con mutaciones puntuales

Los plásmidos de rata para la expresión de HA-GluN1, GFP-GluN2A y GFP-GluN2B fueron amablemente proporcionados por el Dr. Vicini (Centro Médico de la Universidad de Georgetown, Washington, Estados Unidos).

Los cambios de nucleótidos de interés se introdujeron en la secuencia presente en plásmidos HA-GluN1, GFP-GluN2A y GFP-GluN2B, mediante la técnica mutagénesis dirigida, usando el kit QuickChange (Agilent, Cat # 200524). Este proceso se realizó según las instrucciones del fabricante y en el GeneAmp PCR System 9700 termociclador (Applied Biosystems). Primero se combinaron 100 ng de ADN molde (HA-Grin1 *wt*, GFP-Grin2a *wt* o GFP-Grin2b *wt*) con 125 ng de los pares de *primers* ( *forward* y *reverse*) que contenían la variante genética de interés (diseñados con Software de Agilent, <https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp>; *QuickChange Primer Design*).

Luego se llevó a cabo una PCR donde se utilizaron los reactivos y tiempos recomendados por el fabricante.

El producto de PCR se digirió con 10  $\mu$ L de la enzima de restricción DpnI, la cual produce la degradación del ADN molde (que presenta metilaciones) dejando intacto el producto de PCR que contiene las mutaciones de interés. El producto de PCR resistente a la enzima de restricción DpnI, se transformó en bacterias ultra competentes XL-10 Gold mediante choque térmico (baño de agua a 42 °C durante 45 segundos, seguido de una incubación a 4 °C durante 2 minutos). Luego, las bacterias transformadas fueron resuspendidas en medio Luria Broth (LB) (10 g/L de NaCl, 10 g/L de triptona y 5 g/L de extracto de levadura) y sembradas en placas de agar LB (15 g de agar por 1 L de medio LB) suplementadas con antibiótico (1  $\mu$ g/mL de ampicilina). Las placas de agar se incubaron toda la noche a 37 °C. 24 horas más tarde, se seleccionaron 1 o 2 colonias y se cultivaron en medio LB suplementado con antibiótico (1 ampicilina  $\mu$ g/mL para los plásmidos Grin1, Grin2a, Grin2b) a 220 rpm y 37 °C. Finalmente, el ADN amplificado fue extraído por Núcleo *Spin Plasmid* (NoLid) un Mini kit utilizado para la purificación de ADN plasmídico, lo anterior se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Una pequeña cantidad de DNA plasmídico puro de cada condición fue enviado a secuenciación para confirmar que contenía la mutación de interés. Tras la confirmación que el DNA contenía las mutaciones de los residuos a estudiar en cada subunidad, se procedió a llevar a cabo los experimentos electrofisiológicos funcionales. Para ello, se transfectaron las células HEK 293T con una concentración de DNA total de 1.3 $\mu$ g, en una relación de GluN1/ GluN2/ GFP 1:2:0.25 , utilizando como sistema de transfección PEI en medio DMEM free, tal cual como se describió anteriormente.

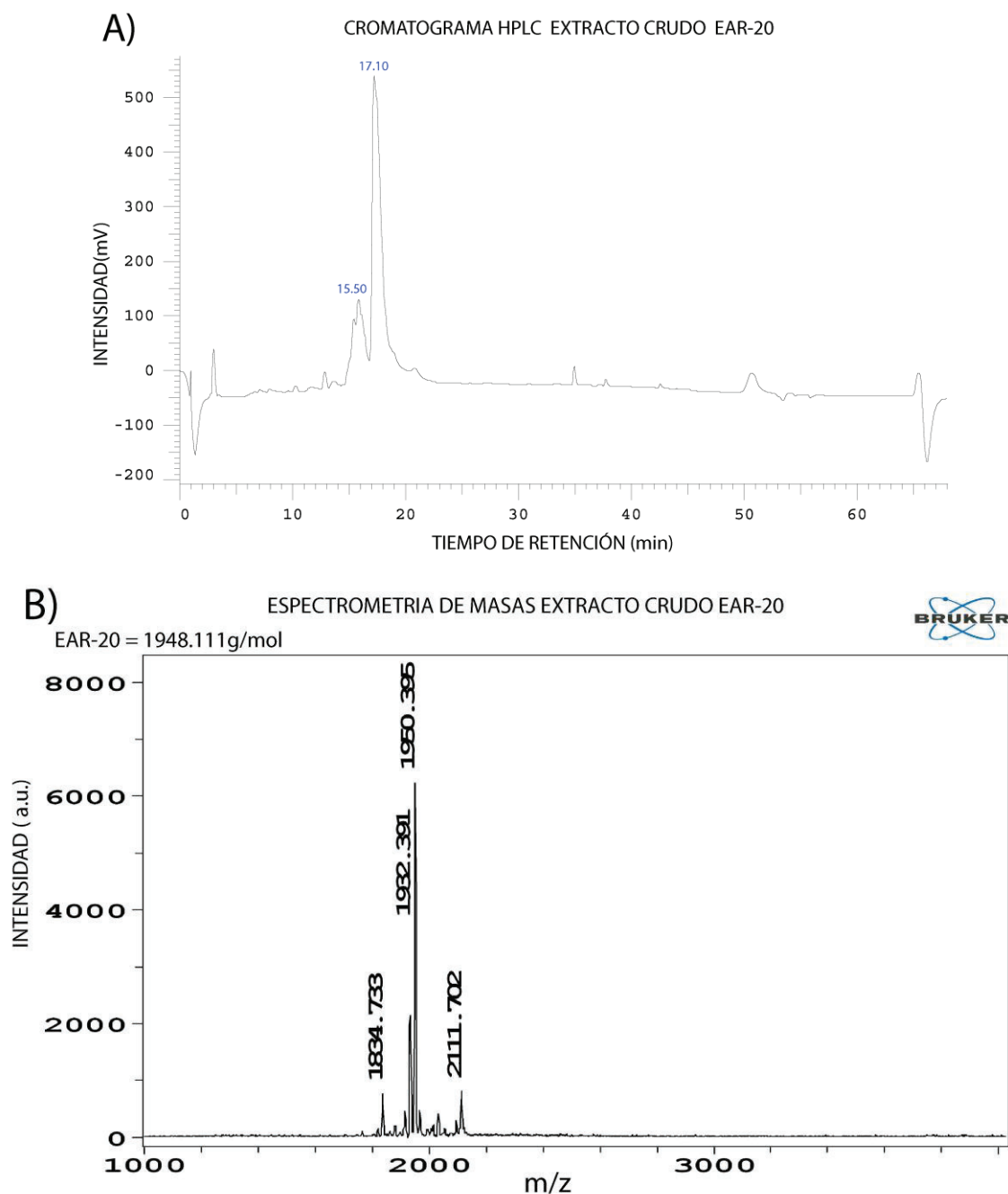


## 4. Resultados

### 4.1 Síntesis, purificación y caracterización del péptido EAR-20

La síntesis de EAR-20 se llevó a cabo empleando mayoritariamente la estrategia de TBTU+DIEA, aunque para los acoples que presentaron el test Kaiser positivo, se realizó un segundo ciclo de acople, utilizando la estrategia de DCC+ Oxyma. El residuo de Leucina (L) ubicado en la posición número 8 de la secuencia de EAR-20, fue el único aminoácido que requirió tres ciclos de acople y el uso de la estrategia DCC. La síntesis asistida por microondas se empleó siempre que se utilizó la estrategia de acople TBTU+DIEA, exceptuándose en los casos cuando los residuos a acoplar fueran el ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E).

Cuando el extracto crudo de EAR-20 fue analizado por HPLC en modalidad analítica, se encontraron aparte de EAR-20, algunos subproductos de reacción. Por esta razón, se observó un pico principal a un tiempo de retención 17.10 min, y un “hombro” a un tiempo de retención 15.50min (Figura 4-1A). De hecho, esto también se logró confirmar a partir de las señales m/z de espectrometría de masas, donde se observaron especies de menor y mayor peso molecular, lo que podría indicar en su orden la presencia de deleciones y de algunos grupos protectores de cadenas reactivas sin desproteger (Figura 4-1B).

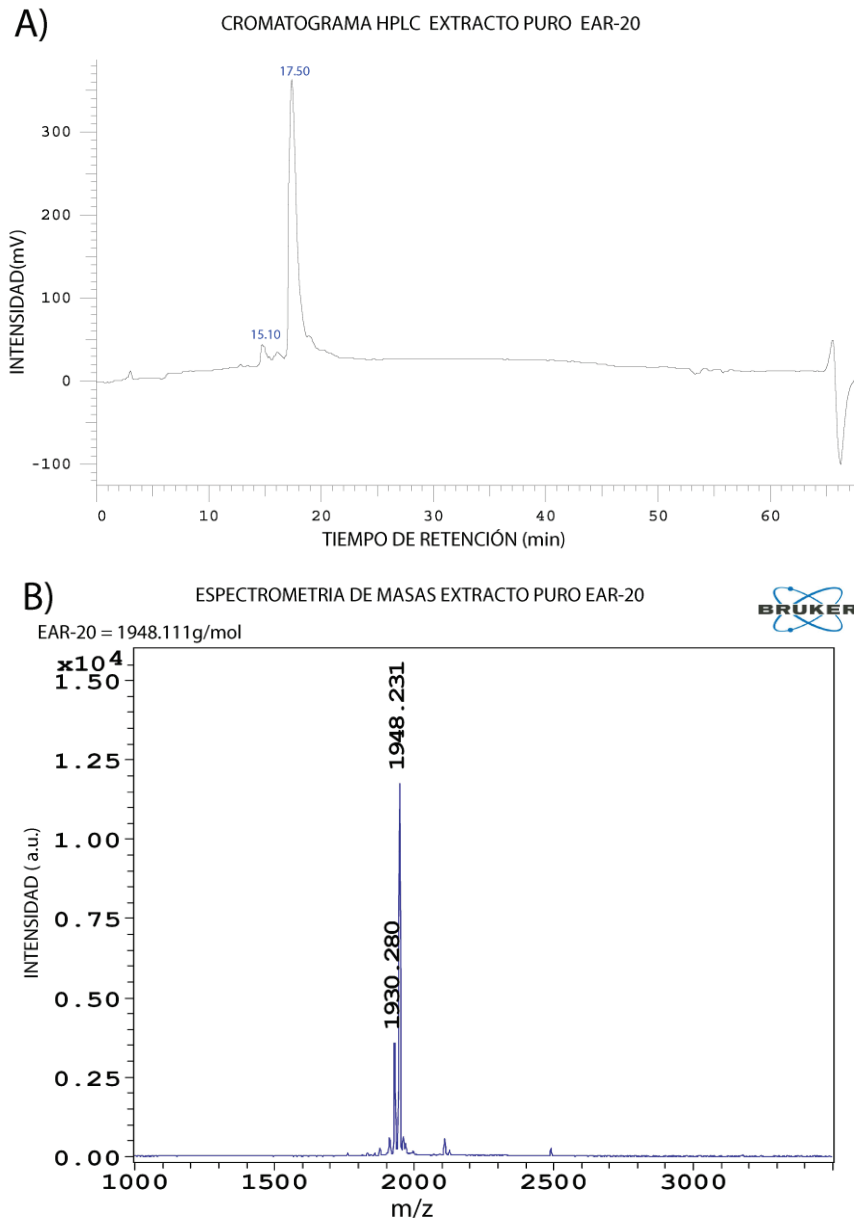


**Figura 4-1:** Resultados de la síntesis del péptido EAR-20. **A)** Cromatograma HPLC del péptido crudo, tiempos de retención de los principales picos: 15.50 y 17.10 minutos. **B)** Espectro de masas péptido crudo, PM teórico: 1948.111 g/mol, PM experimental: 1950.395 g/mol.

Como se mencionó anteriormente, en la síntesis de EAR-20 se generaron algunos subproductos, por lo tanto, se hizo necesario la implementación de un protocolo de purificación mediante HPLC, pero esta vez en modalidad semipreparativa – que se llevó a



cabo con las condiciones y materiales descritos en la metodología. En la purificación de EAR-20 se observó la coelución de dos especies (Figura 4-2A), que no pudieron ser completamente separadas y purificadas por la cromatografía HPLC semipreparativa. Lo anterior, también se logró confirmar mediante espectrometría de masas, donde se observaron en los espectros dos especies con diferentes pesos moleculares (Figura 4-2B).



**Figura 4-2:** Resultados purificación del péptido EAR-20. **A)** Cromatograma HPLC del péptido puro, tiempos de retención de los principales picos: 15.10 y 17.50 minutos. **B)** Espectro de masas péptido puro, PM teórico: 1948.111 g/mol, PM experimental: 1948.231 g/mol.

En cuanto al rendimiento en la síntesis de EAR-20, este se puede describir como bajo, ya que fue del 14.6%. Para calcular este valor, primero se determinó el rendimiento teórico de la síntesis, el cual se calculó a partir de los siguientes valores: sitios activos reportados por el proveedor de la resina *NovaPEG Rink Amide* (0.49 mmol/g), peso de la cantidad de resina utilizada en la síntesis y el peso molecular de EAR-20. El rendimiento total de la reacción se calculó teniendo en cuenta el peso final de EAR-20 (puro), después de las etapas de purificación. Las cantidades de resina-péptido, péptido puro y el rendimiento de la síntesis de EAR-20 se muestran en la Tabla 4-1.

Péptido	Resina-péptido(mg)	R. teórico (mg)	Puro (mg)	Rendimiento (%)
EAR-20	465.0	190.8	27.8	14.6

**Tabla 4-1:** Resultados de la síntesis del péptido EAR-20.

### 4.1.1 Determinación bioinformática de las propiedades fisicoquímicas de EAR-20

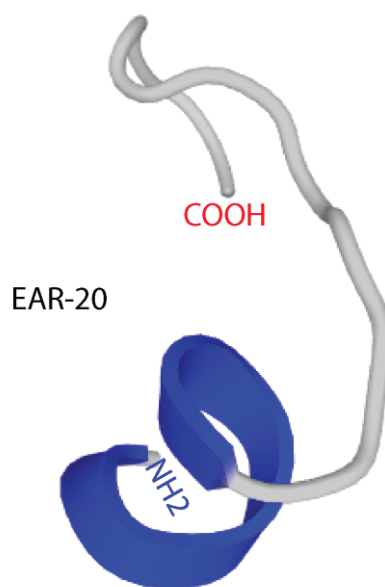
Con el propósito de evaluar las principales propiedades físicas y químicas de EAR-20, se utilizó la herramienta bioinformática Genscript (*peptide property molecular weight calculator-GenScript*, no date). En la tabla 4-2 se muestran las propiedades determinadas mediante la utilización de este programa, de estas sobresalen la baja solubilidad de EAR-20 en agua, la cual fue comprobada experimentalmente, y el porcentaje de propensión de EAR-20 a formar estructuras secundarias ( $\alpha$ -Hélix: **52.9 %**, Lamina  $\beta$ : **5.9%** y Coil: **41.2%**). En esta misma línea y con la intención de conocer algo más de información sobre la posible estructura de EAR-20, se realizó modelamiento de la secuencia de EAR-20 a través de dos programas bioinformáticos PEP-FOLD 3 (Lamiabile *et al.*, 2016) y PEPstrMOD (Singh *et al.*, 2015) que implementan algoritmos especializados para la predicción de estructuras de péptidos. En la figura 4-3, se muestra el principal modelo calculado mediante el análisis de la secuencia de EAR-20 a través de PEP-FOLD 3 y PEDstrMOD respectivamente.

Propiedad	valor
Número de a.as de la secuencia:	17
Peso molecular (g/mol):	1948.11
Formula molecular:	$C_{78}H_{130}N_{24}O_{32}S_1$
Punto isoeléctrico:	3.88
Carga neta a pH 7:	-3.00
Porcentaje de a.as Hidrofóbicos:	29.41
Solubilidad en agua (mg/ml):	0.10
Solubilidad en $NH_4OH$ 1% (mg/ml):	2.00
Porcentaje de propensión de EAR-20 a formar estructuras secundarias:	$\alpha$ -Helices: <b>52.9 %</b> . Lamina $\beta$ : <b>5.9%</b> Turn / Coil: <b>41.2%</b> $\rightarrow$ Posiblemente $\alpha$ -Helices

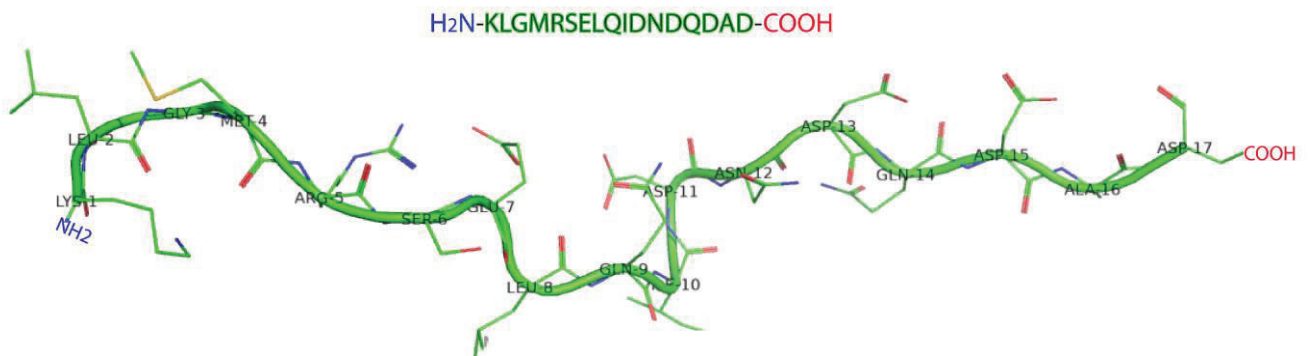
**Tabla 4-2:** Propiedades fisicoquímicas de EAR-20. Calculado mediante herramienta bioinformática Genscript (*peptide property molecular weight calculator-GenScript*).

A)

$H_2N$ -KLGMRSELQIDNDQDAD-COOH



B)



**Figura 4-3:** **A)** Modelamiento de EAR-20 por la herramienta bioinformática PEP-FOLD3 (Lamiable *et al.*, 2016). **B)** Modelamiento de EAR-20 por la herramienta bioinformática PEDstrMOD (Singh *et al.*, 2015).

En figura 4-3 se puede observar que los modelos generados por Pep-fold 3 (figura 4-3A) y PEDstrMOD (figura 4-3B) presentan similitudes estructurales a partir del residuo de glutamato (Glu, E) en la posición 7, más concretamente en la región comprendida entre el E7 y el C-terminal de la secuencia de EAR-20, en cuya región se logra identificar una estructura secundaria de tipo *random coil*. Una situación muy diferente se observa en la región comprendida entre el N-terminal y el residuo serina (Ser, S) en la posición 6, donde en la estructura del péptido EAR-20 se puede observar una pequeña alfa hélice en la simulación llevada a cabo por Pep-fold 3 (figura 4-3A) y un *random coil* en la realizada por PEDstrMOD (figura 4-3B). De todas maneras, estos dos tipos de estructuras secundarias son las que la herramienta bioinformática Genscript predijo como las más probables de que se formen según la secuencia de aminoácidos de EAR-20.

## 4.2 Evaluación funcional del péptido EAR-20

### 4.2.1 Expresión de subunidades recombinantes del NMDAR en células HEK 293T

Reactivo de transfección	DNA total (µg)	Relación (GluN1:GluN2:GFP)	% de células Transfectadas / por cubre	Intensidad de corriente "Registros electrofisiológicos" (pA)
PEI	0.9	1:1:0.5	5	23-300
Xtreme GENE 9	0.9	1:1:0.5	10	0-100
PEI	0.9	1:2:1	15	500-1700
Xtreme GENE 9	0.9	1:2:1	40	0-500
PEI	0.9	1:3:1	20	500-1700
Xtreme GENE 9	0.9	1:3:1	40	0-1000
PEI	1.2	1:2:1	30	1000-2000
Xtreme GENE 9	1.2	1:2:1	50	0-2000
PEI	1.3	1:2:1	50	1000-4000
Xtreme GENE 9	1.3	1:2:1	60	0-3000

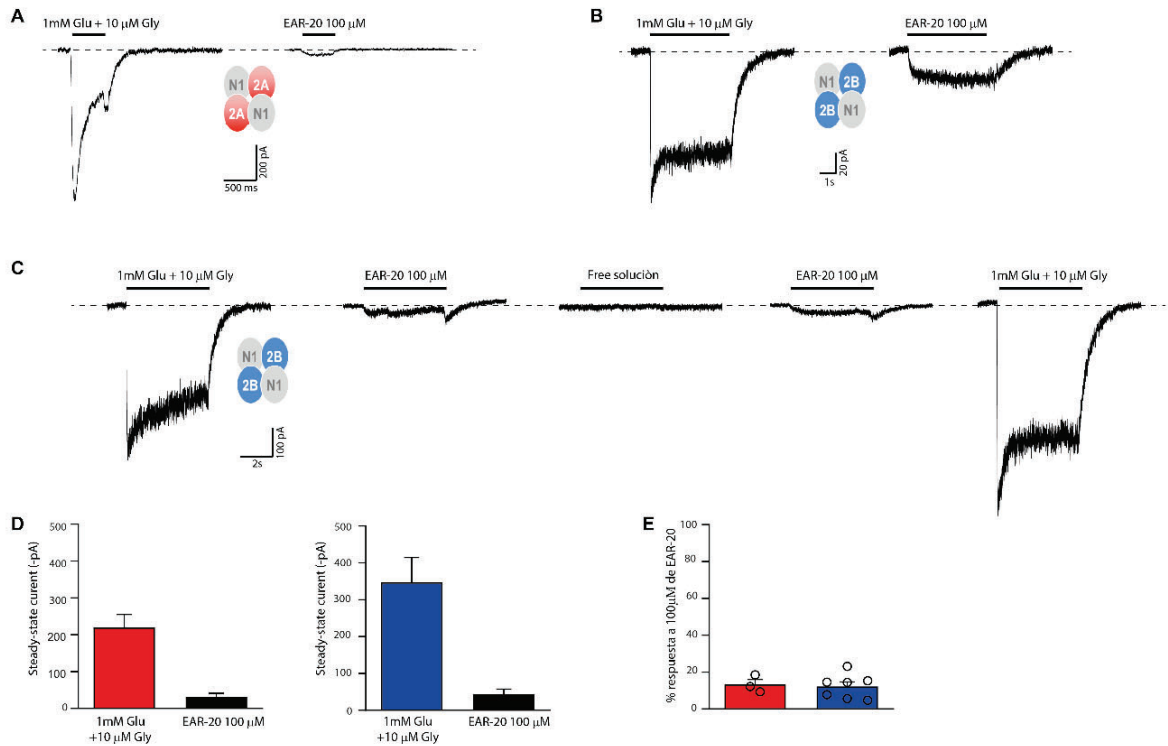
**Tabla 4-3.** Evaluación de diferentes parámetros de transfección para NMDARs en células HEK 293T. Cada parámetro se evaluó mediante registros electrofisiológicos de *patch-clamp* en cinco células, en esta tabla se colocó el menor y mayor valor de corriente encontrado para estos cinco registros.

Como se muestra en la tabla 4-3, la mejor condición de transfección fue aquella en la que se utilizó PEI y una concentración total de DNA de 1.3 µg en una proporción de GluN1-GluN2- GFP de 0.4 ,0.8 y 0.1 µg respectivamente. Estos resultados concuerdan con el hecho de que las subunidades GluN1 presentan mayores tasas de expresión, y como consecuencia, se encuentran en exceso en el retículo endoplasmático (ER) en comparación con la subunidad GluN2, lo que se traduce en una mayor población de subunidades GluN1 disponibles para ensamblarse con las subunidades GluN2 o GluN3 a medida que van siendo sintetizadas (Wenthold *et al.*, 2003). Como resultado de este ensamble en el ER (dos subunidades GluN1 y dos subunidades GluN2) se producen NMDARs con estructura tetramérica, que posteriormente maduran en aparato de Golgi

mediante una serie modificaciones postraduccionales (glicosilación, fosforilación y palmitoilación) que se producen principalmente sobre los dominios CTD de las subunidades GluN2, y que en conjunto controlan el tráfico de los NMDARs a la membrana, cascadas de señalización, recambio de proteínas, localización sináptica, e interacciones con proteínas o lípidos intracelulares (Sanz-Clemente *et al.*, 2013; Lussier *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2020). Por ello, no sorprende el hecho de que se observaran corrientes de mayor magnitud cuando se realizó la transfección con una mayor cantidad de DNA de la subunidad GluN2. Aunque algunos laboratorios han utilizado para sus transfecciones una relación de DNA de 1:3 con respecto a GluN1-GluN2, nosotros observamos que esta condición no genera mayores corrientes y esta ratio de DNA hace que las células se observen incluso más afectadas por la transfección (a nivel morfológico), probablemente por el hecho de que, al introducir mayor cantidad de plásmidos o al existir mayor expresión de NMDARs funcionales, esto se traduzca en un mayor grado de citotoxicidad.

#### **4.2.2 Registros electrofisiológicos en células HEK-293T mediante FAT**

Con el propósito de evaluar el efecto agonista de EAR-20 sobre HEK-293T transfectadas con NMDARs, se hicieron registros electrofisiológicos de *patch-clamp* utilizando el sistema de perfusión rápida (FAT). En estos primeros ensayos electrofisiológicos se aplicó una concentración de 100  $\mu$ M de EAR-20, y como control de la magnitud de corriente tras activación del receptor, se estimuló con los agonistas naturales (1mM Glu y 10  $\mu$ M Gly). Los resultados de estos ensayos electrofisiológicos se muestran en la figura 4-4.



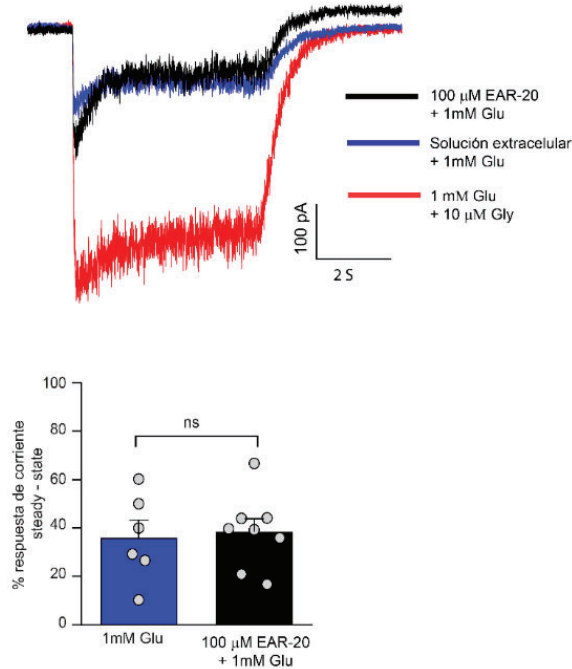
**Figura 4-4:** Efecto agonista del péptido EAR-20. Se realizaron ensayos electrofisiológicos sobre células HEK 293T transfectadas con los di-heterómeros GluN1-GluN2A o GluN1-GluN2B. Tras obtener la configuración de *Whole-Cell*, los NMDARs fueron activados mediante la rápida aplicación de 1 mM Glu y 10 μM Gly, y tras un tiempo de lavado de agonistas mediante el flujo de solución fisiológica control, se realizó la aplicación de 100 μM de péptido EAR-20. **A)** Experimentos realizados sobre células HEK 293T transfectadas con las subunidades GluN1-GluN2A. **B y C,** Experimentos realizados sobre células HEK 293T transfectadas con las subunidades GluN1-GluN2B. **D y E,** Cuantificación de corrientes de los NMDARs (GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B) en el steady -state, evocadas por la aplicación de agonista fisiológicos (1mM Glu y 10 μM) o 100 μM de péptido EAR-20.

En la figura 4-4 se puede observar que el péptido EAR-20 presenta una pequeña actividad agonista, y esta ocurre en ausencia de los agonistas naturales. Esta afirmación está basada en el hecho de que cuando se aplicó solución extracelular (control negativo) sobre las células que previamente presentaban corrientes con la estimulación de agonistas fisiológicos (1mM de Glu y 10 μM de Gly) no se observó ningún tipo de señal de corriente (figura 4-4C, tercera traza), pero cuando se aplicó sobre esta misma célula una concentración de 100 μM de EAR-20 se observó una pequeña corriente, que, de manera importante se produjo en ausencia de Glu y Gly (figura 4-4C).



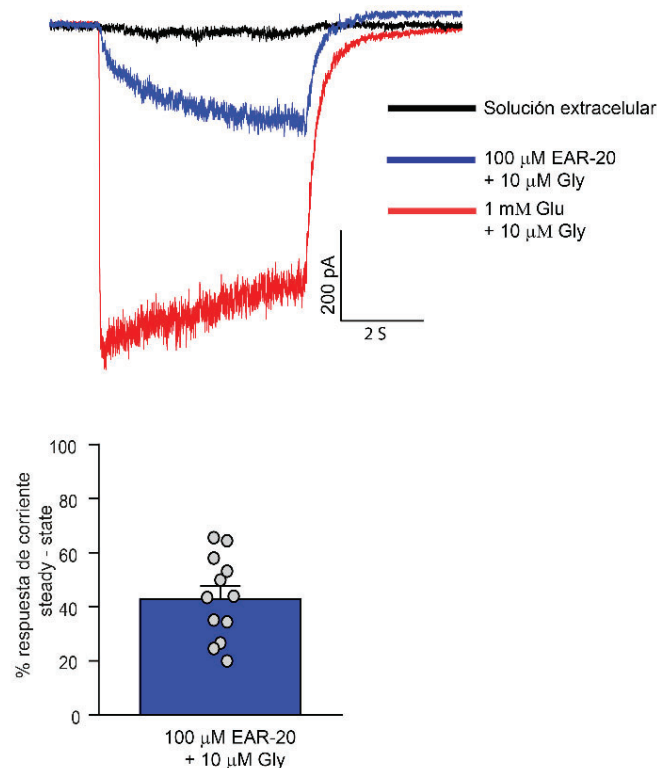
Los resultados de la imagen E en la figura 4-4, muestran que el péptido EAR-20 presenta una actividad agonista similar (resultados no estadísticamente significativos, one sample Wilcoxon test,  $P > 0.05$ ) hacia los di-heterómeros ensamblados con las subunidades GluN2A o GluN2B , donde se observaron porcentajes de respuesta del  $13,31 \pm 6,5\%$  y  $12,18 \pm 6,9\%$  respectivamente. Además de manera muy interesante, cuando se analizó la actividad producto de la aplicación de  $100 \mu\text{M}$  de EAR-20 (figura 4-4, panel C), se observó que los registros *whole cell* presentaban un aumento transitorio de las corrientes evocadas por el MNDAR (*hook current*). Esto se evidenció cuando la solución que contenía el péptido EAR-20 había sido previamente lavada. Este efecto es muy parecido a lo que ha sido descrito en la evaluación de compuestos con actividades potenciadoras de los NMDARs como el sulfato de pregnenolona y UBP 684 (Chopra, Monaghan and Dravid, 2015; Chopra *et al.*, 2017).

Finalmente, se realizaron ensayos electrofisiológicos con el fin de indagar un poco más sobre la actividad agonista mostrada por EAR-20, y poder determinar de alguna manera si este efecto podría verse alterado por la aplicación simultanea de EAR-20 con Glu (figura 4-5) o Gly (figura 4-6).



**Figura 4-5:** Efecto agonista del péptido EAR-20 + Glu. Se realizaron ensayos electrofisiológicos sobre células HEK 293T transfectadas con GluN1-GluN2B. Tras obtener la configuración de *Whole-Cell*, los NMDARs fueron activados mediante la rápida aplicación de 1 mM Glu y 10 μM Gly, y tras un tiempo de lavado de agonistas mediante el flujo de solución fisiológica control, se realizó la aplicación de 100 μM de péptido EAR-20 + 1 mM Glu o 1 mM Glu + solución extracelular. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  SEM de las corrientes registradas en todos los experimentos, **ns** indica que la respuesta de los di-heterómeros GluN1-GluN2B por la aplicación de 100 μM de péptido EAR-20 + 1 mM Glu, en relación con la respuesta mostrada por la aplicación de 1 mM Glu + solución extracelular no fue estadísticamente significativa (one sample Wilcoxon test,  $P > 0.05$ ).

La figura 4-5 muestra que la aplicación de solo Glu (en una concentración saturante de 1 mM) sin adición de Gly produce la activación del NMDAR. Además, en esta figura también se puede observar que la aplicación simultánea de 100 μM de EAR-20 y 1 mM de Glu, origina un pequeño incremento en la corriente evocada por el NMDAR, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (one sample Wilcoxon test,  $P > 0.05$ ) en relación con la activación del NMDAR producto de la aplicación de solo Glu.

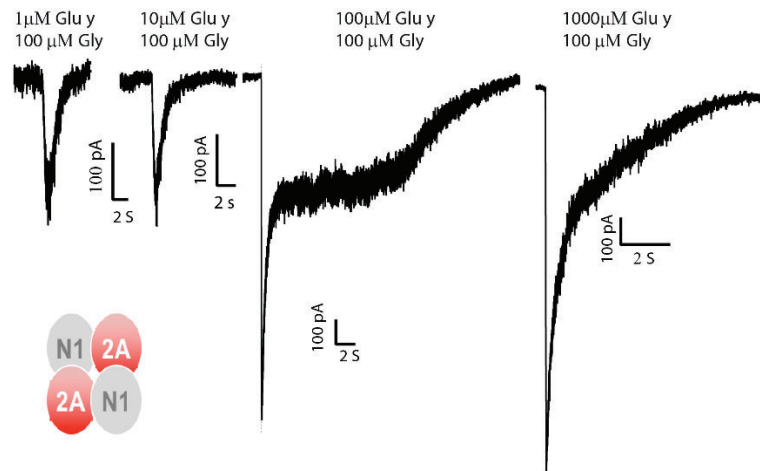


**Figura 4-6:** Efecto agonista del péptido EAR-20 + Gly. Se realizaron ensayos electrofisiológicos sobre células HEK 293T transfectadas con GluN1-GluN2B. Tras obtener la configuración de *Whole-Cell*, los NMDARs fueron activados mediante la rápida aplicación de 1 mM Glu y 10 μM Gly, y tras un tiempo de lavado de agonistas mediante el flujo de solución fisiológica control, se realizó la aplicación de 100 μM de péptido EAR-20 + 10 μM Gly o 10 μM Gly + solución extracelular. La barra representa el valor promedio ± SEM de las corrientes registradas en todos los experimentos (n =12).

En este mismo sentido la aplicación de EAR-20 + Gly indujo una respuesta en el NMDAR del 40% (figura 4-6), este porcentaje fue calculado con respecto a la corriente evocada por el NMDAR tras la estimulación con los agonistas fisiológicos. A diferencia de lo que ocurrió con la aplicación de solo Glu (figura 4-5), la estimulación con Gly + solución extracelular no generó ningún tipo de respuesta del NMDAR. Estos hallazgos corresponden con lo que han encontrado y descrito otros investigadores (Chen *et al.*, 2019).

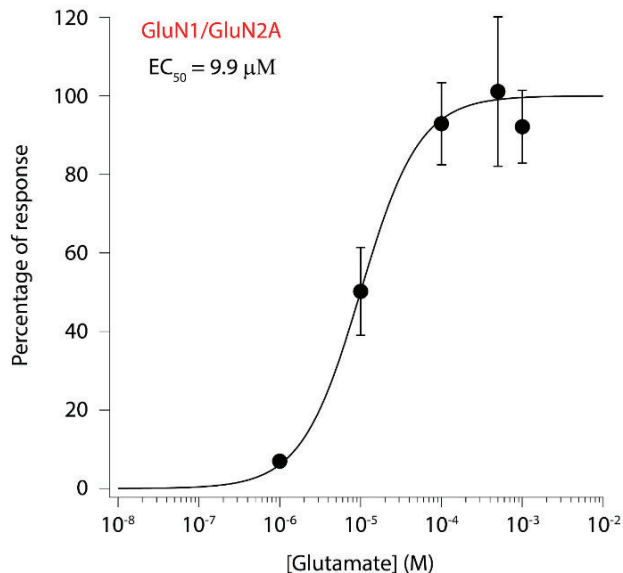
### 4.2.3 Registros electrofisiológicos en células HEK 293T mediante microinyección

Con el fin de poder evaluar las respuestas de los NMDARs tras la aplicación de concentraciones más altas de EAR-20, se llevó a cabo la aplicación del péptido mediante un sistema de microinyección que nos permitió usar pequeños volúmenes de manera de que las concentraciones de EAR-20 ensayadas fueran elevadas sin necesidad de utilizar grandes cantidades del mismo. Para ello, primero se realizó una validación de este sistema de perfusión mediante registros electrofisiológicos sobre células HEK 293T transfectadas con las subunidades GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B. Los NMDARs fueron estimulados con diferentes concentraciones de Glu (1000, 500, 100, 10, 1  $\mu\text{M}$ ) y 100  $\mu\text{M}$  de Gly en todos los experimentos (figura 4-7).

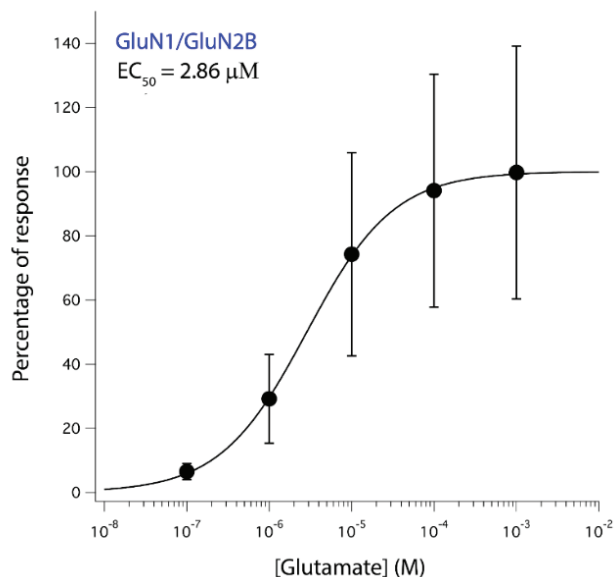


**Figura 4-7:** Ejemplo del registro de corriente del NMDAR realizados para la evaluación del sistema de perfusión microinyección. Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo sobre células HEK 293T transfectadas con los di-heterómeros GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B. Las corrientes fueron evocadas mediante la aplicación de diferentes concentraciones de glutamato (1000, 500, 100, 10, 1  $\mu\text{M}$ ) y 100  $\mu\text{M}$  de glicina en todos los experimentos. Cinco células fueron registradas por cada concentración de Glu.

Lo anterior, se realizó con el objetivo de calcular el valor de  $\text{EC}_{50}$  del Glu con este sistema de microinyección, para luego compararlo con el valor reportado en la literatura, y de esta manera determinar la validez del nuevo método de perfusión (figura 4-8 y 4-9).

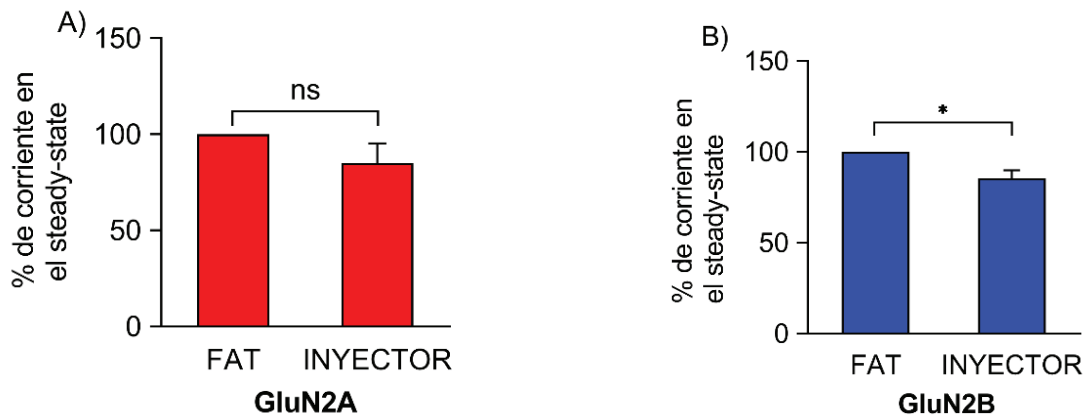


**Figura 4-8:** Curva dosis respuesta para el Glu en di-heterómeros GluN1-GluN2A. Se realizaron registros *de patch-clamp* sobre células HEK 293T transfectadas con GluN1-GluN2A. La aplicación de los agonistas se llevó a cabo mediante el sistema de perfusión de microinyección. Se registraron 5 células para cada concentración de Glu, cada una por triplicado.



**Figura 4-9:** Curva dosis respuesta para el Glu en di-heterómeros GluN1-GluN2B. Se realizaron registros *de patch-clamp* sobre células HEK 293T transfectadas con GluN1-GluN2B. La aplicación de los agonistas se llevó a cabo mediante el sistema de perfusión de microinyección. Se registraron 5 células para cada concentración de Glu, cada una por triplicado.

Los resultados de las curvas de dosis respuesta para los receptores compuestos por GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B (figuras 4-8 y 4-9), mostraron que las concentraciones  $EC_{50}$  del Glu mediante el método de microinyección estaban alrededor de  $9,9 \mu\text{M}$  y  $2,86 \mu\text{M}$  respectivamente. Al comparar estos valores de  $EC_{50}$  para el Glu con los reportados en la literatura,  $3,3 \mu\text{M}$  (GluN2A) y  $2,9 \mu\text{M}$  (GluN2B) (Traynelis *et al.*, 2010), se puede observar que estos valores presentan gran concordancia situándose en ambos casos en el mismo rango de magnitud. En relación con lo anterior, y con el propósito de corroborar estos resultados, se realizaron ensayos electrofisiológicos sobre células HEK-293T transfectadas con las subunidades GluN1-GluN2A (figura 4-10 A) y GluN1-GluN2B (figura 4-10 B), donde se adicionó agonistas mediante los dos diferentes sistemas de perfusión, el FAT (ampliamente utilizado en laboratorios de electrofisiología) y el microinyector (sistema en evaluación) sobre la misma célula. Las corrientes evocadas por los NMDARs se cuantificaron en el steady-state, debido a que en este estado desensibilizado del NMDAR se logra obtener una cuantificación más precisa.



**Figura 4-10:** Validación del sistema de perfusión microinyector. Se realizaron Ensayos electrofisiológicos sobre células HEK-293T transfectadas con las subunidades GluN1-GluN2A (rojo) y GluN1-GluN2B (azul), donde se aplicaron los agonistas (1mM Glu y 100  $\mu\text{M}$  Gly) sobre la misma célula mediante los sistemas de perfusión FAT y microinyector. **A)** Magnitud de la corriente (cuantificada sobre el *steady-state*) evocada por el di-heterómero GluN1-GluN2A al aplicar agonistas a través del FAT y el microinyector. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  SEM de las corrientes registradas en todos los experimentos ( $n=5$ ), **ns** indica que la respuesta de los di-heterómeros GluN1-GluN2A por la aplicación de los agonistas mediante los dos métodos de perfusión no fue estadísticamente significativa (one sample Wilcoxon test,  $P > 0.05$ ). **B)** Magnitud de la corriente (cuantificada sobre el *steady-state*) evocada por el di-heterómero GluN1-GluN2B al aplicar agonistas a través del FAT y microinyector. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  SEM de las corrientes registradas en todos los experimentos ( $n=7$ ), **\*** indica que la respuesta de los di-heterómeros GluN1-GluN2B por la aplicación de los agonistas

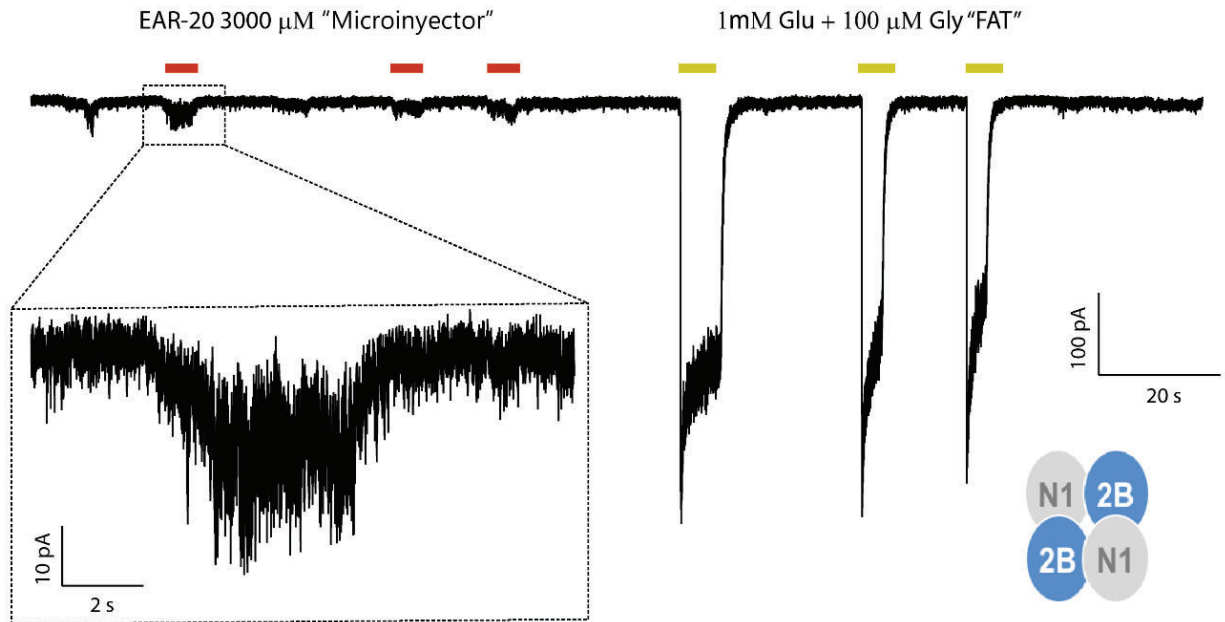
mediante los dos métodos de perfusión fue estadísticamente significativa (one sample Wilcoxon test,  $P < 0.0156$ ).

En base en estos resultados, se encontró que las diferencias entre las respuestas (corriente *steady-state*) de GluN1-GluN2A cuando se aplicó agonistas mediante FAT o microinyector, no fueron estadísticamente significativas (figura 4-10A). Sin embargo, con GluN1-GluN2B, las diferencias entre las corrientes registradas por la estimulación mediante los dos sistemas de perfusión sobre la misma célula si fueron estadísticamente significativas (figura 4-10B). Esta discrepancia podría explicarse por el hecho de que la probabilidad de apertura y cinética de activación de los NMDARs ensamblados con las subunidades GluN2A son mayores, que para los receptores ensamblados con las subunidades GluN1-GluN2B (Sanz-Clemente et al., 2013; Vieira *et al.*, 2020). Por lo tanto, cuando las células fueron estimuladas por una rápida aplicación con menos caudal de agonistas (por el menor diámetro interno de la punta de la micropipeta) mediante microinyección, las corrientes en el *steady-state* fueron menores para los NMDARs ensamblados con GluN1-GluN2B. De acuerdo con estos resultados, se concluyó que el sistema de perfusión por microinyección podría ser utilizado para la dosificación del péptido EAR-20 durante los ensayos electrofisiológicos, aunque debía ser necesaria la aplicación de un pequeño factor de corrección sobre las magnitudes de las corrientes cuando se realizaran experimentos con GluN1-GluN2B.

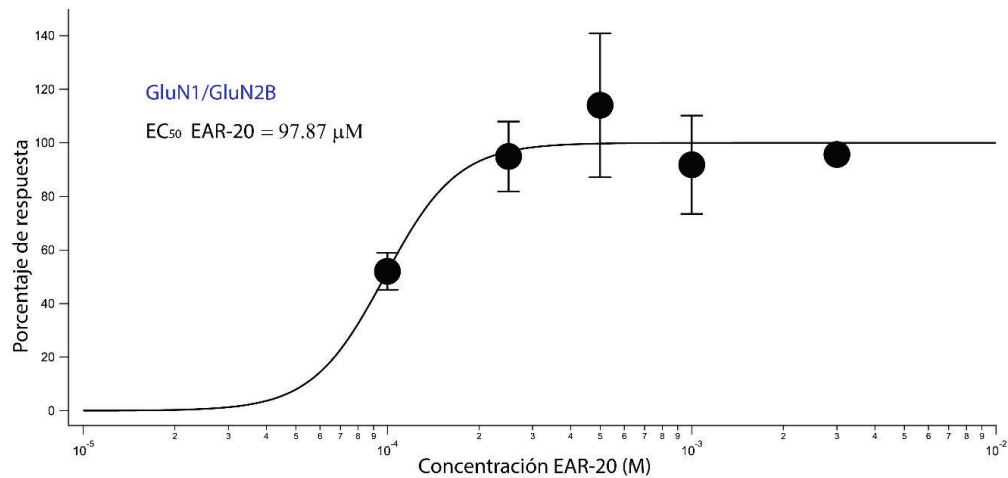
#### **4.2.4 Curva dosis respuesta de EAR-20 como agonista**

Tras este proceso de validación, se procedió a evaluar concentraciones más altas del péptido EAR-20 (250, 300, 500, 1000 y 3000  $\mu\text{M}$ ) que no se habían podido evaluar mediante el FAT. Ante la necesidad de contar con un control positivo (corriente evocada por la aplicación de agonistas fisiológicos) que nos permitiera relacionar estas corrientes con las generadas por la aplicación de EAR-20, se decidió utilizar los dos sistemas de perfusión de forma simultánea: con el microinyector se aplicaba la concentración de EAR-20 a evaluar, y tras un tiempo de lavado del péptido, se aplicaba agonistas sobre la misma célula mediante el FAT (figura 4-11). De esta manera se logró calcular la  $EC_{50}$  del péptido EAR-20 (figura 4-12), ya que se comparó el porcentaje de corriente producida por el EAR-20 respecto al control (1mM Glu y 100  $\mu\text{M}$  Gly).



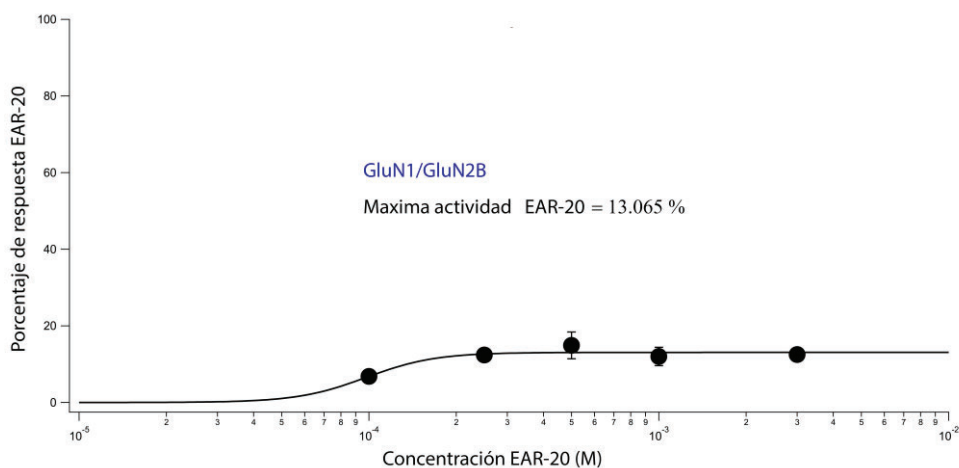


**Figura 4-11:** Evidencia de la actividad agonista del péptido EAR-20. Se realizaron registros electrofisiológicos sobre células HEK 293T transfectadas con GluN1-GluN2B. Los registros se realizaron con los sistemas de perfusión microinyector (3000 μM de EAR-20) y FAT (1 mM Glu y 100 μM Gly) como control de la magnitud de la corriente.



**Figura 4-12:** Curva dosis respuesta para EAR-20. Se registraron corrientes de células HEK 293T transfectadas con GluN1-GluN2B, los ensayos electrofisiológicos se realizaron mediante los sistemas de perfusión microinyector, con el cual se dosificaron las diferentes concentraciones de EAR-20 (250, 300, 500, 1000 y 3000 μM). Se analizaron 5 células para cada concentración de EAR-20, cada una por triplicado.

Cuando se evaluaron concentraciones de EAR-20 superiores a 100  $\mu\text{M}$  como se muestra en la figura 4-11, se ve un incremento de la corriente evocada por los NMDARs, como consecuencia de una mayor activación de los NMDARs por la aplicación de EAR-20. Al comparar el máximo efecto de EAR-20 con respecto al control (1 mM Glu y 100  $\mu\text{M}$  Gly) se encuentra que este corresponde a  $13,06 \pm 0,97$  % de la corriente máxima evocada por la aplicación de glutamato y glicina (figura 4-13).

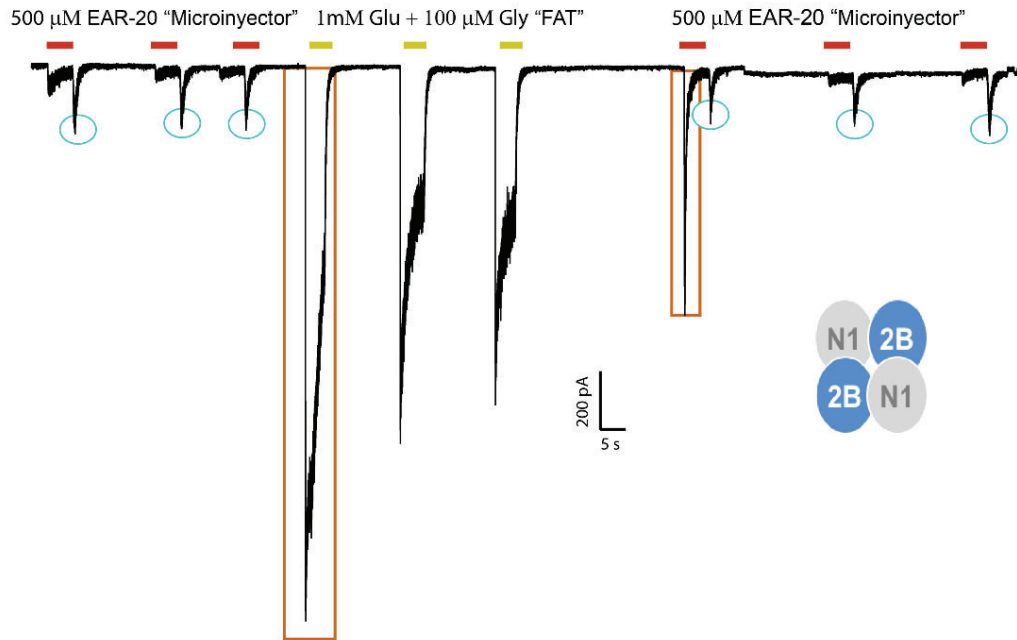


**Figura 4-13:** Porcentajes de respuesta de EAR-20 con respecto a la corriente evocada por la rápida aplicación mediante el FAT de los agonistas fisiológicos (1 mM Glu y 100  $\mu\text{M}$  Gly), este último se utilizó como control de las corrientes del NMDAR. Se registraron cinco células para cada concentración de EAR-20, cada una por triplicado.

En la figura 4-13 se puede observar que tras la aplicación de 250  $\mu\text{M}$  de EAR-20 se logra el efecto máximo en la corriente del NMDAR, y, por ello, no se observa un incremento en la corriente, cuando se estimularon las células con mayores concentraciones de EAR-20. Estos resultados refuerzan los hallazgos discutidos previamente en los cuales se demostró la actividad agonista del péptido EAR-20.

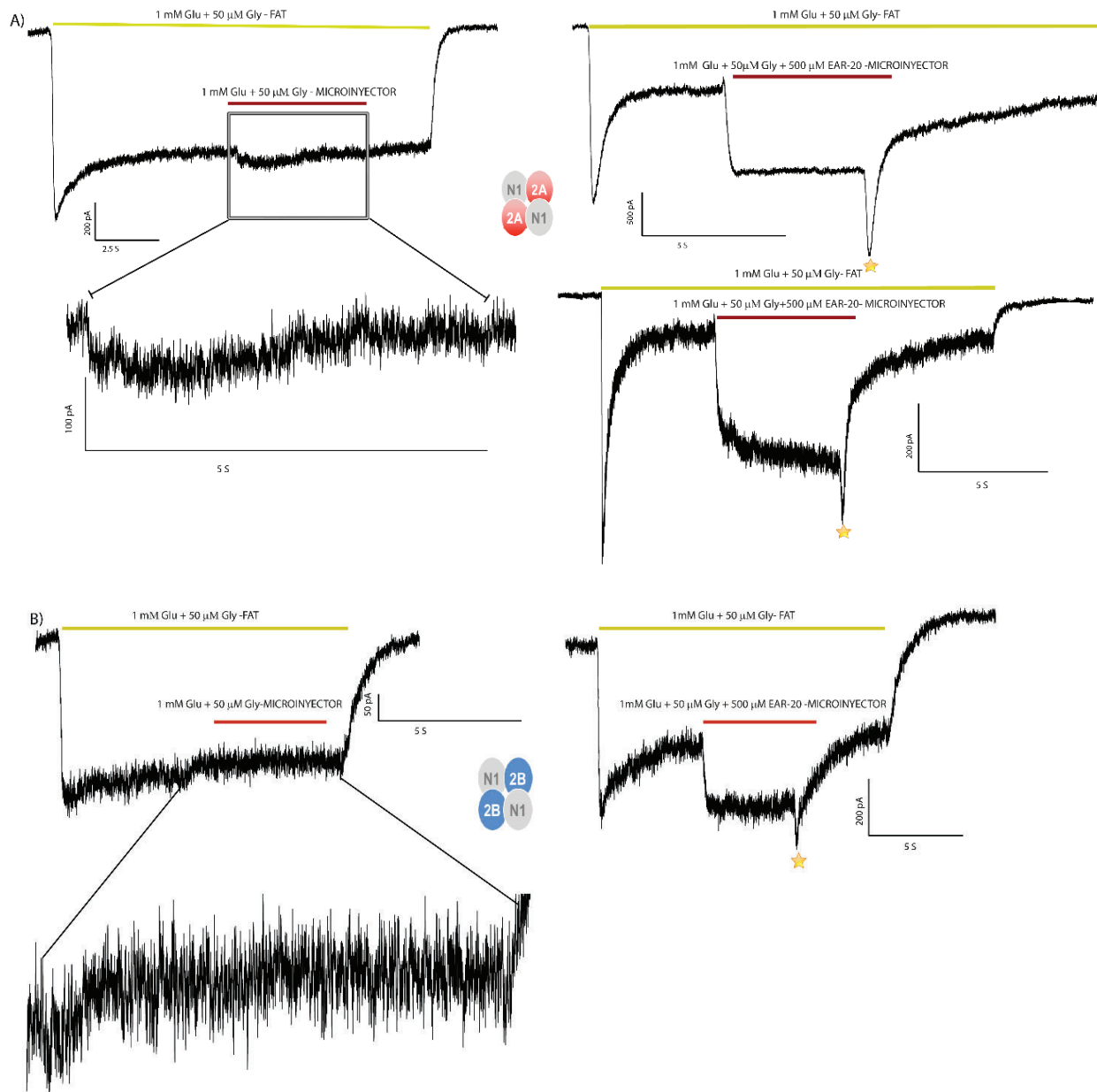
### 3.2.5 Actividad PAM de EAR-20

En los registros electrofisiológicos donde se utilizaban los dos sistemas de perfusión observamos que, cuando no se lavaban los agonistas o el EAR-20 del baño durante suficiente tiempo, existía un incremento en la actividad de los NMDARs (figura 4-14).



**Figura 4-14:** Evidencia de la actividad PAM de EAR-20. Los ensayos electrofisiológicos se realizaron sobre los di-heterómeros GluN1-GluN2B mediante los sistemas de perfusión microinyector (500 μM EAR-20) y FAT (1 mM Glu y 100 μM Gly). Se observó un aumento transitorio en la corriente de los NMDARs cuando la solución de EAR-20 era lavada (círculos de color cian). Además, también se identificó un incremento de la actividad de los NMDARs luego de la aplicación de EAR-20 y agonistas (rectángulos naranjas).

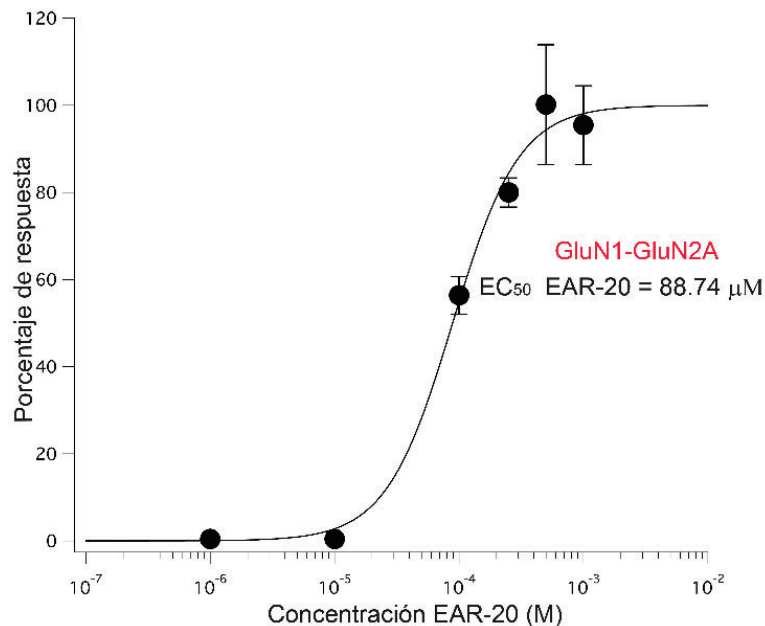
Este aumento en la actividad del receptor podría explicarse al hecho de que pudiera existir una cantidad de EAR-20 en el baño que facilitara la potenciación de las corrientes del NMDAR tras su activación por los agonistas Glu y Gly. Por este motivo, se decidió diseñar unos experimentos con el objetivo de evaluar la actividad del péptido EAR-20 como un posible *positive allosteric modulator* (PAM) de los NMDARs. Para este propósito se utilizó la metodología reportada por Chopra *et al.* 2017 (Chopra *et al.*, 2017), la cual consistía en primero obtener una respuesta estable en el *steady-state* producto de la estimulación con Glu y Gly, y luego proceder a la aplicación de una concentración del compuesto a evaluar, todo esto bajo condiciones saturantes de agonistas (Chopra *et al.*, 2017). Esta metodología la adaptamos a nuestras condiciones experimentales, donde primero se estimularon las células (transfectadas con GluN2A o GluN2B) con agonistas mediante el FAT, y tras llegar a tener una respuesta estable en el *steady-state*, se aplicó mediante el microinyector la concentración de EAR-20 a evaluar (Figura 4-15).



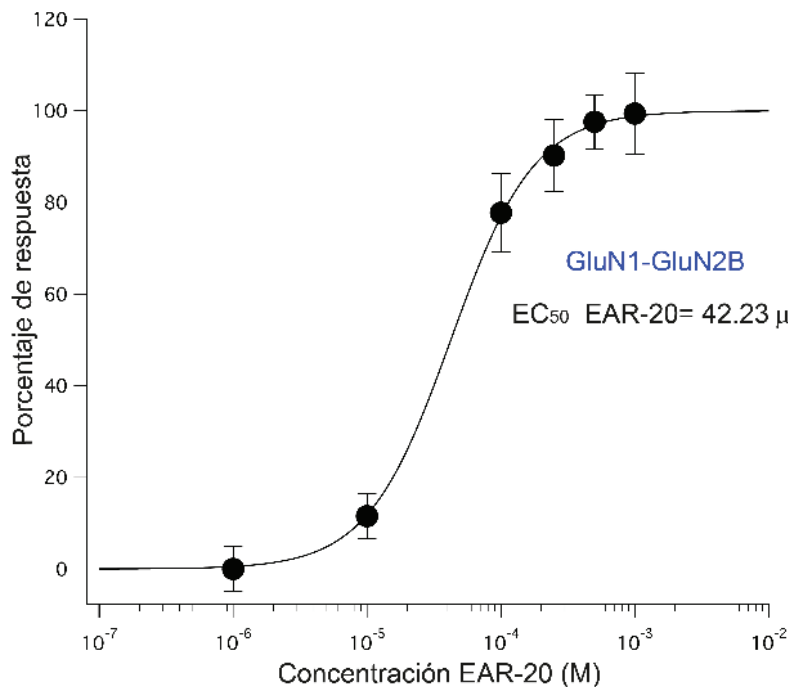
**Figura 4-15:** Corrientes evocadas del NMDAR tras la aplicación de agonistas + 500  $\mu\text{M}$  EAR-20. **A)** Registro electrofisiológico realizados sobre células HEK-293T transfectadas con el di-heterómero GluN1-GluN2A mediante la aplicación de 1 mM Glu y 50  $\mu\text{M}$  Gly hasta una respuesta estable de equilibrio entre el estado desensibilizado y abierto del receptor (*steady-state*). Durante este periodo se aplicó EAR-20 a 500  $\mu\text{M}$  (disueltos en solución extracelular con 1 mM Glu y 50  $\mu\text{M}$  Gly) mediante microinyección durante 5s. **B)** Registro electrofisiológico realizados sobre células HEK-293T transfectadas con el di-heterómero GluN1-GluN2B en las mismas condiciones que en A. En **A** y **B** se observa que la aplicación de EAR-20 produce una respuesta potenciadora de la actividad de los agonistas, además de observarse un aumento transitorio de la corriente del NMDAR posterior al lavado de EAR-20 y agonistas (★).

#### 4.2.6 Curvas dosis respuesta de EAR-20 como potenciador de las corrientes mediadas por GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B.

Utilizando la metodología descrita en la figura 4-15, se ensayaron diferentes concentraciones del péptido EAR-20 (1, 10, 100, 250, 500 y 1000  $\mu\text{M}$ ) disueltas en solución extracelular con 1 mM Glu y 100  $\mu\text{M}$  Gly. De esta manera se logró determinar la concentración efectiva 50 ( $\text{EC}_{50}$ ) del péptido EAR-20 como potenciador de las corrientes de los NMDARs conformados por GluN1-GluN2A o GluN1-GluN2B (figura 4-16 y 4-17 respectivamente).



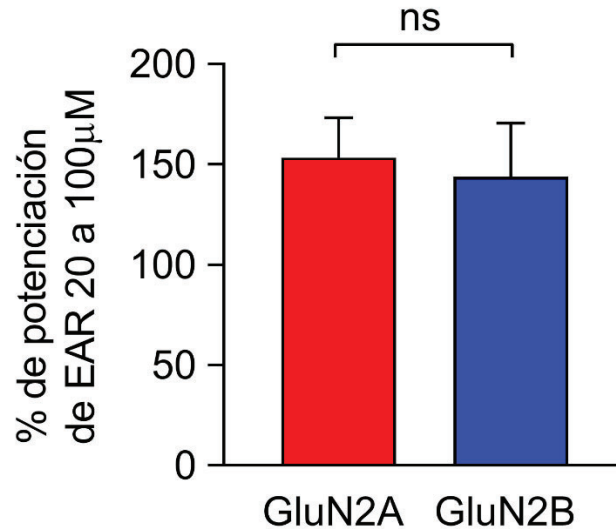
**Figura 4-16:** Curva dosis respuesta de EAR-20 como PAM del NMDAR ensamblado con GluN1-GluN2A. Se realizaron registros electrofisiológicos de *patch-clamp* sobre células HEK 293T transfectadas con las subunidades GluN1 y GluN2A. El NMDAR fue activado mediante la aplicación de 1mM Glu y 100  $\mu\text{M}$  Gly hasta obtener una respuesta estable en el *steady-state*, y a continuación se adicionó el péptido EAR-20 (1, 10, 100, 250, 500 y 1000  $\mu\text{M}$ ) disuelto en solución extracelular con agonistas mediante microinyección durante 5s. Se analizaron 5 células para cada concentración de EAR-20, cada una ellas por triplicado.



**Figura 4-17:** Curva dosis respuesta de EAR-20 como PAM del NMDAR ensamblado con GluN1-GluN2B. Se realizaron registros electrofisiológicos de *patch-clamp* sobre células HEK 293T transfectadas con las subunidades GluN1 y GluN2B. El NMDAR fue activado mediante la aplicación de 1mM Glu y 100 μM Gly hasta obtener una respuesta estable en el *steady-state*, y a continuación se adicionó el péptido EAR-20 (1, 10, 100, 250, 500 y 1000 μM) disuelto en solución extracelular con agonistas mediante microinyección durante 5s. Se analizaron 5 células para cada concentración de EAR-20, cada una ellas por triplicado.

Las EC<sub>50</sub> para EAR-20 como PAM de las respuestas de los NMDARs ensamblados con GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B fueron 88.74 y 42.23 μM respectivamente. La afinidad de EAR-20 hacia los NMDARs ensamblados con GluN2B es ligeramente mayor, ya que a una concentración menor de EAR-20 activa en mayor medida las corrientes NMDARs, lo cual se puede observar en la figura 4-17. En este mismo sentido en la figura 4-15B se puede observar que el tiempo de desactivación es un poco más lento para los NMDARs que contienen la subunidad GluN2B, lo que confirmaría de alguna manera la mayor afinidad de EAR-20 por los NMDAR conformados con la subunidad GluN2B. Es importante mencionar que a pesar de que la EC<sub>50</sub> de EAR-20 sobre GluN1-GluN2B fue menor, no significa que EAR-20 tenga una mayor actividad PAM en los NMDARs que contenían esta subunidad. Por lo contrario, la mayor actividad PAM de EAR-20 se observó sobre los NMDARs

ensamblados con la subunidad GluN2A, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (figura 4-18).

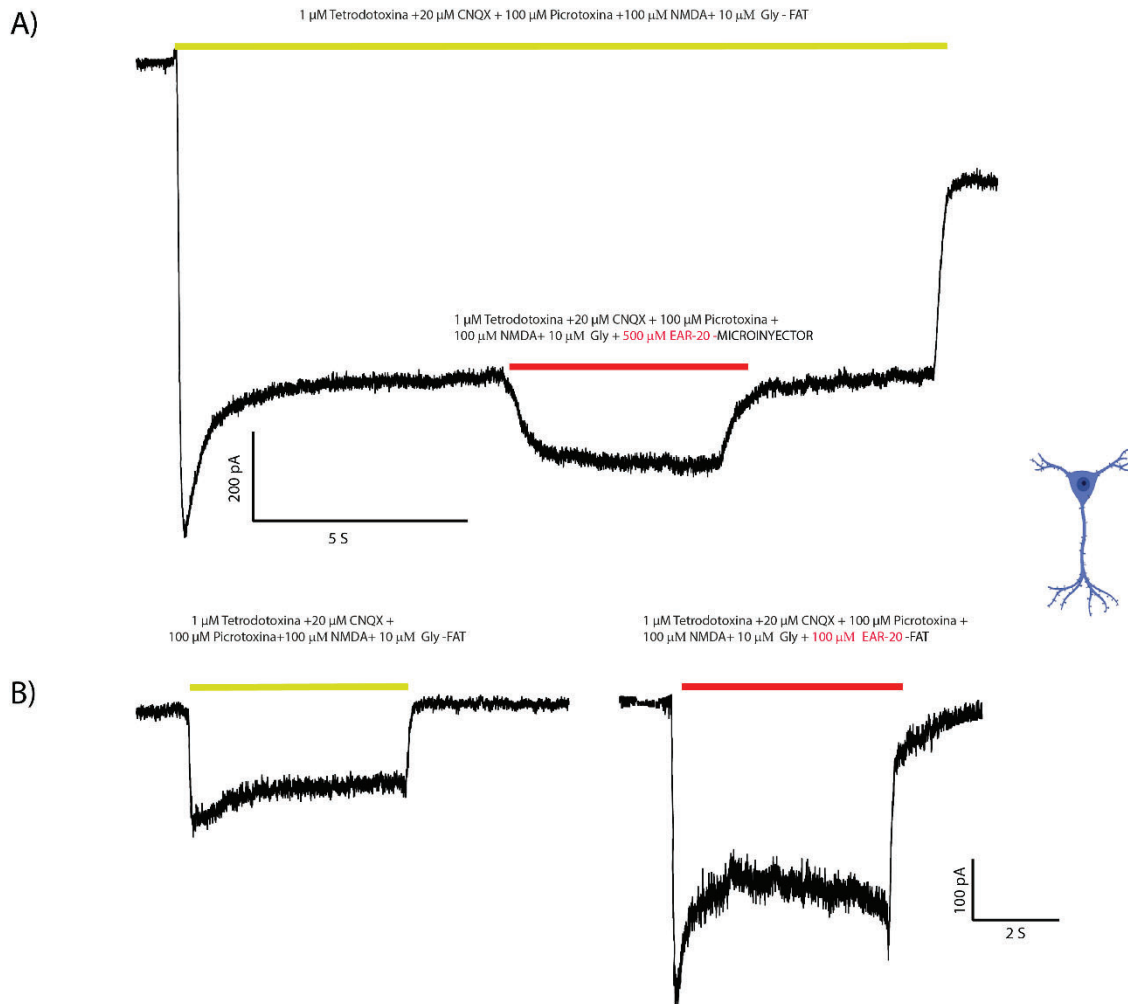


**Figura 4-18:** Actividad PAM de EAR-20 en células HEK 293T transfectadas con los di-heterómeros GluN1-GluN2A o GluN1-GluN2B (153.30 y 143.75% respectivamente). Los porcentajes de potenciación se cuantificaron con respecto a las corrientes registradas sobre el *steady-state* tras la rápida aplicación de solución con agonistas mediante el FAT (1mM Glu y 50 μM Gly), en comparación con las corrientes generadas sobre el *steady-state* tras la rápida aplicación de agonistas + 100 μM EAR-20. Las barras representan el valor promedio ± SEM de las corrientes generadas por la aplicación de agonistas + 100 μM EAR-20 en todos los experimentos, **ns** indica que el efecto potenciador de EAR-20 sobre los di-heterómeros GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B no fue estadísticamente diferente (t- test,  $P > 0.05$ ). Se registraron 14 células en la configuración *whole cell* para cada subtipo de NMDAR.

De acuerdo con lo anterior, EAR-20 produjo una potenciación máxima de la corriente de  $153.30 \pm 19.9$  % en los NMDARs ensamblados con GluN1-GluN2A y  $143.75 \pm 26.8$  % en los ensamblados con GluN1-GluN2B, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre el efecto potenciador de EAR-20 sobre los dos subtipos del NMDAR (t-test,  $P > 0.05$ ). Los anteriores porcentajes de potenciación se cuantificaron con respecto a las corrientes registradas sobre el *steady-state* por la rápida aplicación de solución con agonistas mediante el FAT (1mM Glu y 50 μM Gly), en comparación con las corrientes generadas sobre el *steady-state* por la rápida aplicación de agonistas más 100 μM EAR-20.

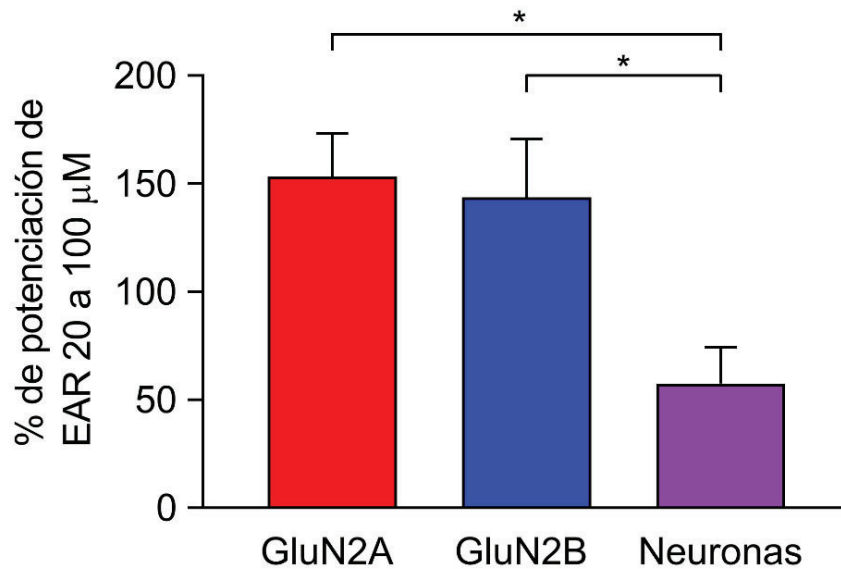


## 4.2.7 Actividad potenciadora de EAR-20 sobre neuronas hipocampales



**Figura 4-19:** Registros electrofisiológicos en neuronas hipocampales. A) Los NMDARs fueron activados mediante la aplicación con el FAT de 100  $\mu\text{M}$  NMDA y 10  $\mu\text{M}$  Gly, en solución extracelular con bloqueadores hasta obtener una corriente estable en el *steady-state*, tras lo que se aplicó mediante microinyección durante 5 segundos Agonistas + 500  $\mu\text{M}$  de EAR-20 disuelto en solución extracelular con bloqueadores. B) Registros electrofisiológicos en neuronas hipocampales mediante una rápida aplicación por el FAT de agonistas o agonistas + 100  $\mu\text{M}$  de EAR-20. Se analizaron 5 neuronas cada una por triplicado.

En la figura 4-19A se observa que la aplicación de 500  $\mu\text{M}$  de EAR-20 produce un aumento de las corrientes hipocampales mediadas por los NMDARs lo cual se ve reflejado en el aumento del *steady-state*. Con el objetivo de determinar el porcentaje de activación de EAR-20, se registraron neuronas hipocampales mediante la rápida aplicación mediante el FAT de agonistas o agonistas más 100  $\mu\text{M}$  de EAR-20 (figura 4-19B), encontrándose que la actividad PAM de EAR-20 sobre neuronas hipocampales estaba alrededor de un  $57.58 \pm 16.7\%$  (Figura 4-20).



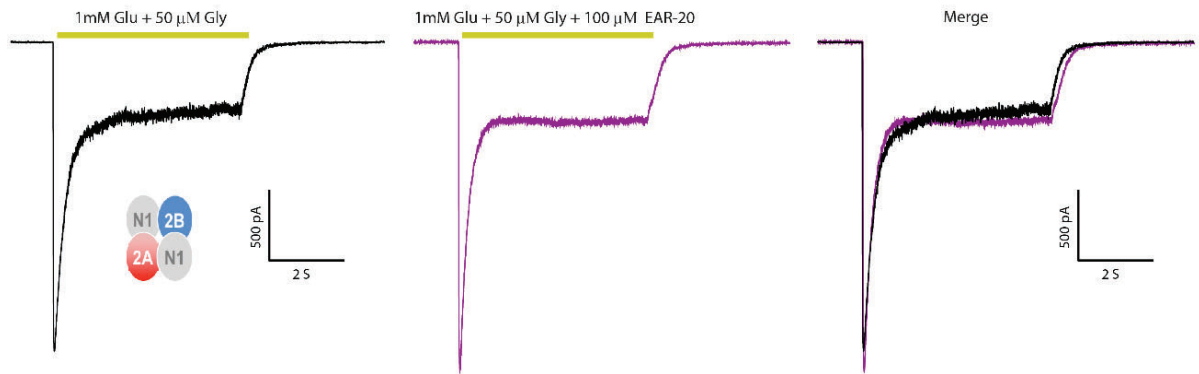
**Figura 4-20:** Actividad PAM de EAR-20 sobre células HEK 293T transfectadas con los di-heterómeros GluN1-GluN2A o GluN1-GluN2B, sobre neuronas hipocampales en cultivo de ratón. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  SEM de las corrientes generadas por la aplicación de agonistas + 100  $\mu\text{M}$  EAR-20 en todos los experimentos, \* indica que el efecto potenciador de EAR-20 sobre las neuronas hipocampales fue estadísticamente diferente al efecto potenciador de EAR-20 sobre los di-heterómeros GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B (one-way ANOVA  $P < 0.05$ ). Se registraron 14 células mediante *patch-clamp* en la configuración *whole cell* para los di-heterómeros GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B, y 5 neuronas hipocampales cada una por triplicado.

Este porcentaje de respuesta fue considerablemente menor a los porcentajes observados para GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B, los cuales fueron 153.30 y 143.73% respectivamente. Estas diferencias en la actividad PAM de EAR-20 sobre células HEK 293T transfectadas con GluN1-GluN2A o GluN1-GluN2B, y neuronas hipocampales, pueden ser atribuidas al hecho de que, en neuronas hipocampales de ratones neonatos y adultos, se ha descrito una mayor población de NMDARs ensamblados como tri-

heteroméros GluN1-GluN2A-GluN2B, pudiendo representar esta población hasta 1/3 del total de los NMDARs presentes en un hipocampo adulto, y por lo tanto, constituyen un componente importante para las sinapsis glutamatérgicas en CA1 y CA3 (Rauner and Köhr, 2011; Hansen *et al.*, 2014).

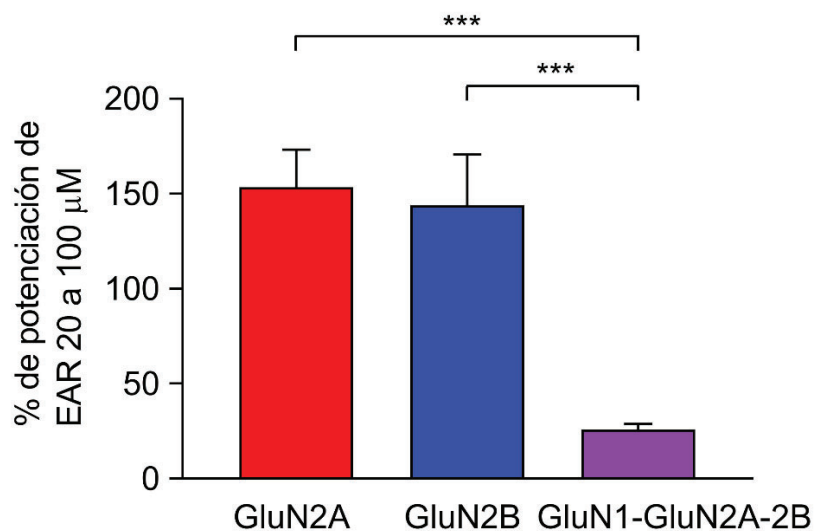
#### **4.2.8 Actividad potenciadora de EAR-20 sobre el tri-heterómero GluN1-GluN2A-GluN2B.**

Con el propósito de entender los menores porcentajes de respuesta encontrados en los ensayos con neuronas hipocampales, se estudió la actividad PAM de EAR-20 sobre los tri-heteroméros GluN1-GluN2A-GluN2B, expresados en células HEK 293, siguiendo los pasos de transfección mencionados en la metodología. Para estos experimentos, con el fin de asegurar la expresión del receptor tri-heteromérico y no tener contaminaciones de receptores di-heteroméricos, se siguió la metodología reportada por Stroebel *et al.* 2014 (Stroebel *et al.*, 2014), en la cual se utilizaron los plásmidos GluN1-6A, GluN2A- r1 y GluN2B- r2. Estos plásmidos contienen modificaciones tales como la adición de 6 alaninas (6A) en el dominio C-terminal de la subunidad GluN1, y la unión de un segmento de los dominios C-terminales de los receptores GABA-B1 y GABA-B2 (que están acoplados a proteína G y poseen sitios de retención en el retículo endoplasmático) sobre la región C-terminal de las subunidades GluN2A (GABA-B1) y GluN2B (GABA-B2) respectivamente. Estas modificaciones realizadas sobre las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B, permitieron la expresión exclusiva de tri-heteroméros GluN1-GluN2A-GluN2B del NMDAR sobre la superficie de las células HEK 293T (figura 4-21), debido a que los receptores di-heteroméricos co-expresados (que contienen un solo tipo de subunidad GluN2) son retenidos intracelularmente en el retículo endoplasmático, y por lo tanto no se expresan en la membrana celular de las células HEK 293T.



**Figura 4-21:** Registros electrofisiológicos de *patch-clamp* sobre los tri-heteroméros GluN1-GluN2A-GluN2B mediante una rápida aplicación con el FAT de agonistas o agonistas + 100  $\mu$ M de EAR-20. Se registraron 12 células cada una por triplicado.

En la figura 4-22 se muestra la cuantificación de los registros electrofisiológicos realizados sobre células HEK 293T transfectadas con los plásmidos GluN1-6A, GluN2A- r1 y GluN2B-r2. En esta se observa que la potenciación sobre los tri-heteroméros GluN1-GluN2A-GluN2B tras la aplicación de 100  $\mu$ M de EAR-20 es apenas del  $25.84 \pm 3.0\%$  (barra morada), significativamente inferior a la potenciación determinada para los di-heterómicos GluN1-GluN2A (barra roja) y GluN1-GluN2B (barra azul), la cual fue del 153.30 y 143.75% respectivamente (figura 4-22).



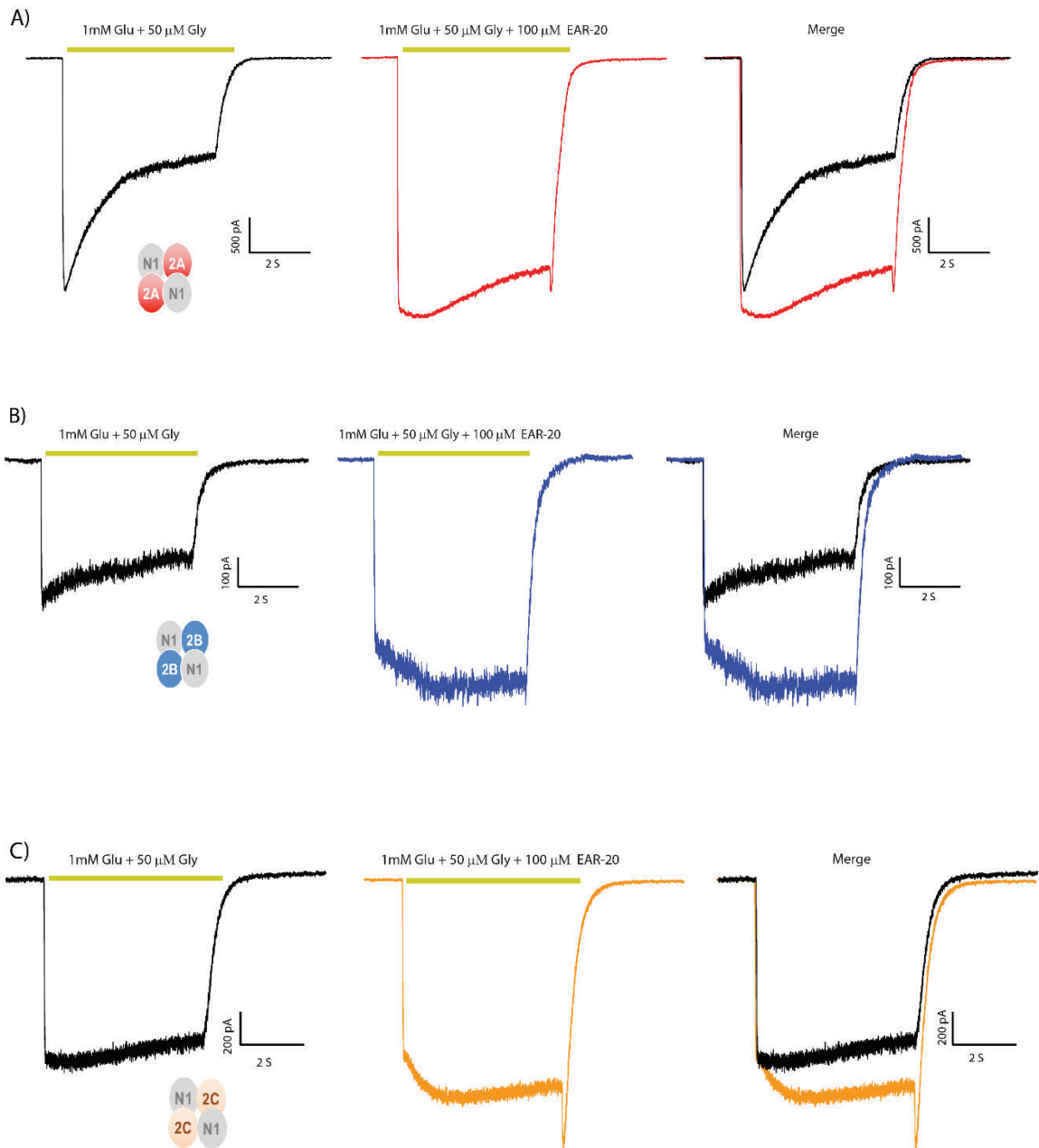
**Figura 4-22:** Actividad PAM de 100  $\mu$ M de EAR-20 sobre células HEK 293T transfectadas con los plásmidos GluN1-6A, GluN2A-r1 y GluN2B-r2, los cuales permiten la expresión exclusiva de los tri-heteroméros GluN1-GluN2A-GluN2B. Los ensayos electrofisiológicos se realizaron mediante estimulación con 1mM Glu y 50  $\mu$ M Gly durante 5s, tras un periodo de lavado de agonistas con solución control, se aplicó 100  $\mu$ M de péptido EAR-20 con

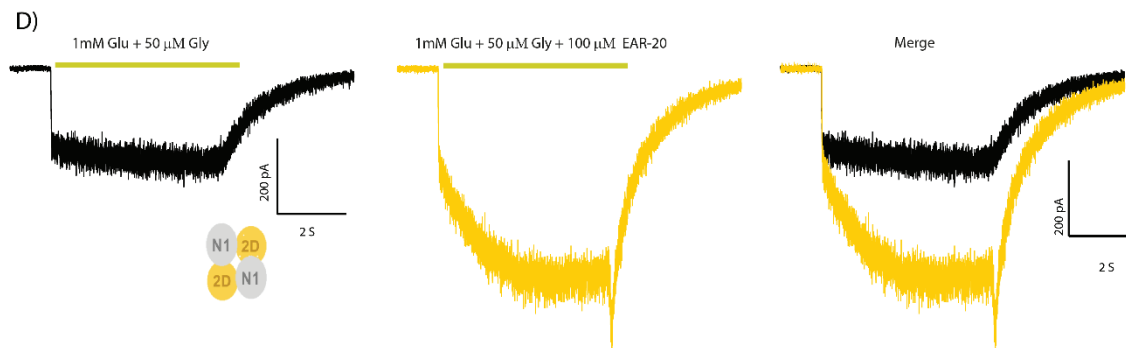
agonistas (1mM Glu y 50  $\mu$ M Gly) durante 5s con el sistema de perfusión FAT. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  SEM de las corrientes generadas por la aplicación de agonistas + 100  $\mu$ M EAR-20 en todos los experimentos, \*\*\* indica que el efecto potenciador de EAR-20 sobre los tri-heterómeros GluN1-GluN2A-GluN2B fue estadísticamente diferente al efecto potenciador de EAR-20 sobre los di-heterómeros GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B (one-way ANOVA  $P < 0.05$ ). Se registraron 14 células en la configuración *whole cell* para los di-heterómeros GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B, y 12 células para los tri-heterómeros GluN1-GluN2A-GluN2B cada una por triplicado.

Lo anterior, nos lleva a sugerir que la baja potenciación observada en neuronas hipocampales en comparación con los di-heterómeros GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B, podría explicarse debido a que en neuronas hipocampales de ratones neonatos y adultos, la población de NMDARs predominante corresponde a los tri-heterómeros GluN1-GluN2A-GluN2B (Rauner and Köhr, 2011), sobre los cuales la actividad PAM de EAR-20 es significativamente menor. Apoyando la anterior observación, está el hecho de que muchos autores han reportado que las propiedades farmacológicas como desensibilización por glutamato y la modulación alostérica exhibida por los tri-heterómeros GluN1-GluN2A-GluN2B es muy diferente a la observada en los di-heterómeros GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B (Hansen *et al.*, 2014; Stroebel, Casado and Paoletti, 2018; Gibb, 2022).

#### **4.2.9 Actividad PAM de EAR-20 sobre los di-heterómeros GluN1-GluN2C y GluN1-GluN2D**

Una vez determinado el efecto del péptido EAR-20 sobre los di-heterómeros (GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B), tri-heterómeros GluN1-GluN2A-GluN2B y neuronas hipocampales, quisimos evaluar la actividad de EAR-20 sobre otros dos subtipos de di-heterómeros, por un lado GluN1-GluN2C (con mayor expresión en el cerebelo y bulbo olfatorio en fase adulta) y GluN1-GluN2D (con mayor expresión en el diencefalo y mesencefalo en fase postnatal) del NMDAR que se expresan en menor proporción en el CNS (Sanz-Clemente *et al.*, 2013; Paoletti, Bellone and Zhou, 2013). Para ello se realizó la transfección de las células HEK-293T con los plásmidos que permitieron la expresión de este subtipo de NMDARs, tal como se describió previamente en la metodología. En la figura 4-23 se muestran los resultados de los registros electrofisiológicos realizados sobre los diferentes di-heterómeros del NMDAR (GluN1-GluN2A, GluN1-GluN2B, GluN1-GluN2C y GluN1-GluN2D) mediante la aplicación de 100 $\mu$ M de EAR-20.

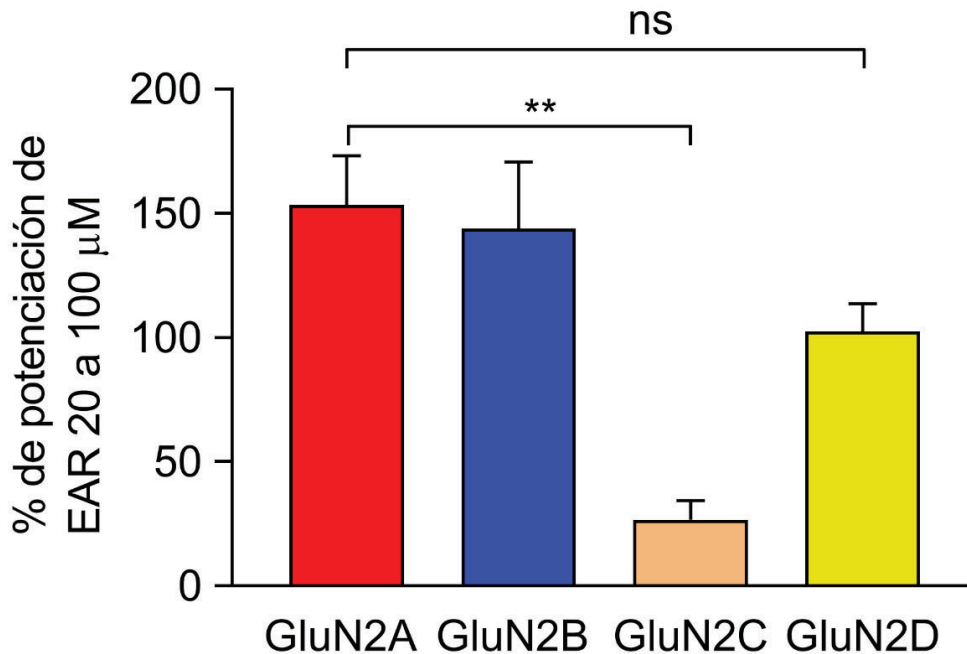




**Figura 4-23 :** Registros electrofisiológicos de *patch-clamp* en modalidad *whole cell* sobre células HEK-293T transfectadas con los di-heterómeros GluN1-GluN2A, GluN1-GluN2B, GluN1-GluN2C y GluN1-GluN2D. Los NMDARs fueron activados mediante la rápida aplicación de agonistas o agonistas + 100  $\mu$ M de EAR-20, utilizando para este propósito el sistema de perfusión FAT. **A)** Actividad PAM de EAR-20 sobre el di-heterómero GluN1-GluN2A, se registraron 14 células cada una por triplicado. **B)** Actividad PAM de EAR-20 sobre el di-heterómero GluN1-GluN2B, se registraron 14 células cada una por triplicado. **C)** Actividad PAM de EAR-20 sobre el di-heterómero GluN1-GluN2C, se registraron 8 células cada una por triplicado y **D)** Actividad PAM de EAR-20 sobre el di-heterómero GluN1-GluN2D, se registraron 8 células cada una por triplicado.

En esta misma figura se pueden observar las diferentes propiedades fisiológicas que experimentan los diferentes di-heterómeros del NMDAR, como por ejemplo la baja o casi nula desensibilización que sufren los receptores GluN1-GluN2D (figura 4-23D), que contrasta con la alta desensibilización mostrada por los receptores GluN1-GluN2A (figura 4-23A). Además, debido a que los di-heterómeros GluN1-GluN2D presentan mayor afinidad por los agonistas, se puede percibir como las corrientes se mantienen por mucho más tiempo, incluso segundos, sin sufrir un declive (desensibilización) de las mismas. Esto está en marcado contraste con el comportamiento mostrado por los otros di-heterómeros, cuyos tiempos de apertura están en el rango de milisegundos (Vicini *et al.*, 1998). Este hecho está directamente relacionado con los tiempos de desactivación, ya que como se observa en la figura 4-23D es mucho más lento el lavado de los agonistas en el di-heterómero GluN1-GluN2D, que en los otros NMDARs (Vieira *et al.*, 2020; Vicini *et al.*, 1998).





**Figura 4-24:** Actividad PAM de 100  $\mu\text{M}$  de EAR-20. La actividad PAM de EAR-20 se evaluó mediante registros de *patch-clamp* sobre células HEK-293T transfectadas con los di-heterómeros GluN1-GluN2A, GluN1-GluN2B, GluN1-GluN2C y GluN1-GluN2D. Se registraron 14 células para GluN1-GluN2A, 14 células para GluN1-GluN2B, 8 células para GluN1-GluN2C y 8 células para GluN1-GluN2D cada una por triplicado. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  SEM de todos los resultados por cada condición. \*\* indica que el efecto de 100  $\mu\text{M}$  de EAR-20 sobre GluN1-GluN2C fue significativamente diferente de las otras tres condiciones (one-way ANOVA  $P < 0.05$ ).

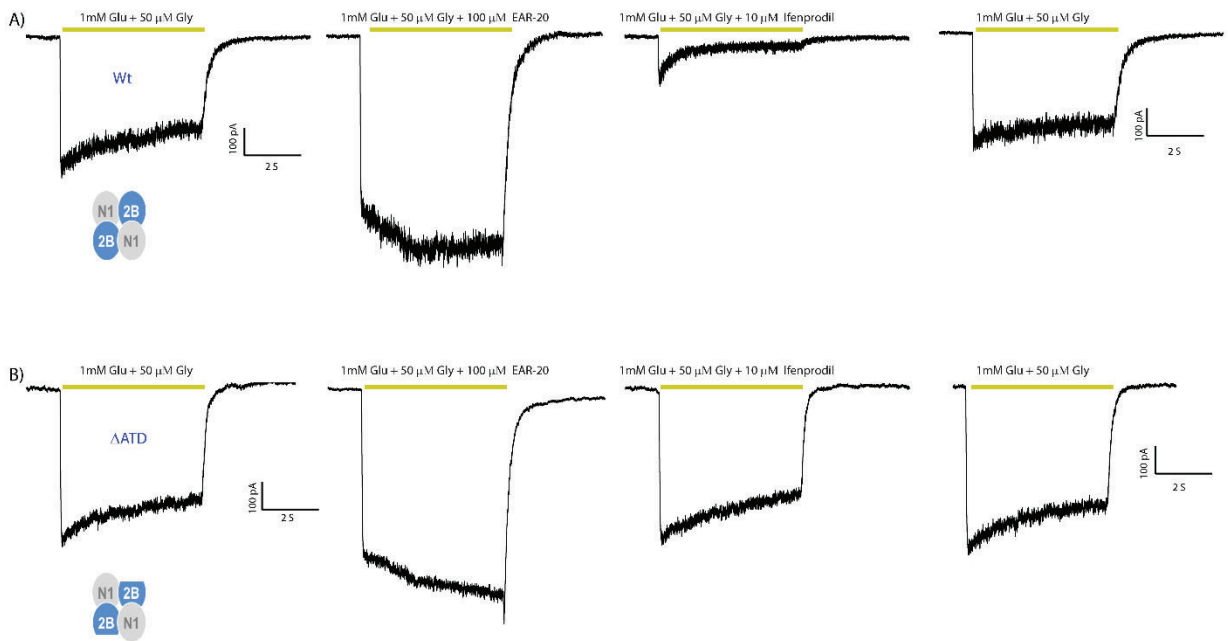
En cuanto a la actividad PAM de EAR-20 sobre los diferentes di-heterómeros del NMDARs, en la figura 4-24 se puede observar que esta fue alta para los di-heterómeros GluN1-GluN2A, GluN1-GluN2B y GluN1-GluN2D, siendo de  $153.30 \pm 19.9$ ,  $143.75 \pm 26.8$  y  $102.45 \pm 11.1$  % respectivamente, y sin diferencias estadísticamente significativas entre estas combinaciones (one-way ANOVA,  $P > 0.05$ ). Sin embargo, la actividad PAM de EAR-20 sobre los di-heterómeros GluN1-GluN2C fue de tan solo  $26.59 \pm 7.7$  % (one-way ANOVA,  $P < 0.0017$ ). Estos resultados muestran una considerable actividad PAM de EAR-20 sobre los di-heterómeros del NMDARs ensamblados con las subunidades GluN2A, GluN2B y GluN2D, y una baja actividad PAM hacia los ensamblados con GluN2C.

### **4.3 Predicción *in silico* y validación *in vitro*, del posible sitio de unión del péptido EAR-20 sobre el NMDAR**

Debido a la interesante actividad PAM mostrada por el péptido EAR-20, la cual se ha descrito anteriormente, se hace necesario la identificación del sitio de unión del péptido EAR-20 sobre el NMDAR. En relación a esto, se ha descrito que la interfase entre dominios LBD (*Ligand Binding Domain*) de las subunidades del heterotetrámero del NMDAR es una región clave para la unión de compuestos con actividad PAM, ya que la unión de moléculas en esta región puede producir cambios conformacionales que modulan el *gating* en los NMDARs (Bledsoe *et al.*, 2019). Por lo tanto, con el objetivo de disminuir el gasto computacional en los estudios *in silico*, se realizaron registros electrofisiológicos de *patch-clamp* en células HEK 293T transfectadas con NMDARs desprovistos de los ATDs (GluN1-GluN2A  $\Delta$ ATD y GluN1-GluN2B  $\Delta$ ATD). Esto nos permite descartar una gran región de aproximadamente 400 residuos, la cual ha sido descrita como no esencial para la expresión en la membrana celular de NMDARs funcionales (Madry *et al.*, 2007; Paoletti *et al.*, 2000). Además, esta estrategia ya ha sido utilizada por otros investigadores para la evaluación de otros compuestos PAM como GNE-6901 y GNE-8324 (Hackos *et al.*, 2016)

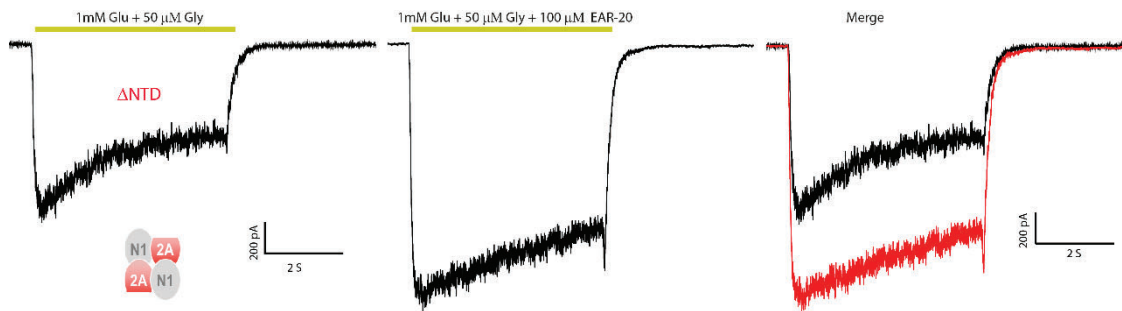
#### **4.3.1 Ensayos electrofisiológicos sobre NMDARs con el ATD delecionado**

Para llevar a cabo los registros electrofisiológicos con EAR-20 sobre los NMDARs desprovistos de los ATDs, primero transfectamos células HEK 293T con los plásmidos pGEMHE NR1-1a  $\Delta$ ATD (GluN1a $^{\Delta$ ATD), pRK5 NR2A  $\Delta$ ATD (GluN2A $^{\Delta$ ATD) y pRK5 NR2B  $\Delta$ ATD (GluN2B $^{\Delta$ ATD) tal y como se describió en la metodología. Para estos experimentos, primero se realizó una validación que permitieran comprobar que los receptores expresados en las células HEK 293T contaban con la deleción del ATD, para ello se utilizó ifenprodil el cual es un modulador alostérico negativo, cuyo sitio de unión se encuentra localizado en la interfase de los ATDs de los NMDARs ensamblados con la subunidad GluN2B (Karakas, Simorowski and Furukawa, 2011). Esta validación se realizó sobre receptores *Wild-Type* (*Wt*) GluN1-GluN2B y receptores desprovistos de los ATDs GluN1-GluN2B $^{\Delta$ ATD; estos resultados se muestran en la figura 4-25.

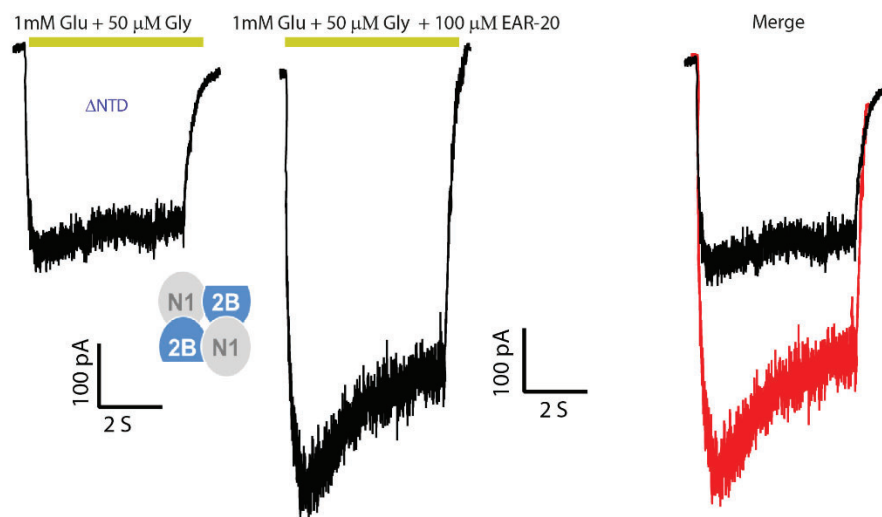


**Figura 4-25:** Validación de la expresión de los NMDARs GluN1-GluN2B<sup>ΔATD</sup>. **A)** Registros electrofisiológicos de *patch-clamp* sobre células HEK 293T transfectadas con NMDARs GluN1-GluN2B (*Wt*). **B)** Registros electrofisiológicos de *patch-clamp* sobre células HEK 293T transfectadas con NMDARs desprovistos de los ATDs GluN1-GluN2B<sup>ΔATD</sup> ( $\Delta$ ATD).

En la figura 4-25 se observa una disminución en la corriente de los NMDARs GluN1-GluN2B de alrededor de un 90% tras de la aplicación de 10  $\mu$ M de ifenprodil en solución extracelular con agonistas. Sin embargo, en las células que expresaban los NMDARs con la delección GluN1-GluN2B<sup>ΔATD</sup> no se observó ningún tipo de actividad NAM cuando se aplicó ifenprodil ( figura 4-25B). Esto es debido a que el ifenprodil tiene su sitio de unión sobre la interfase entre los ATDs de las subunidades GluN1 y GluN2B , donde se han descrito que los residuos E236, Q110 y F176 localizados en los ATDs de las subunidades GluN2B y el S132 en GluN1, son claves para la actividad NAM de ifenprodil (Stroebel *et al.*, 2016). Estos experimentos confirman que las células HEK 293T expresaron los NMDARs con ATDs delecionados. Los resultados de la evaluación del péptido EAR-20 sobre receptores GluN1-GluN2A<sup>ΔATD</sup> y GluN1-GluN2B<sup>ΔATD</sup>, se muestran en las figuras 4-26 y 4-27 respectivamente.

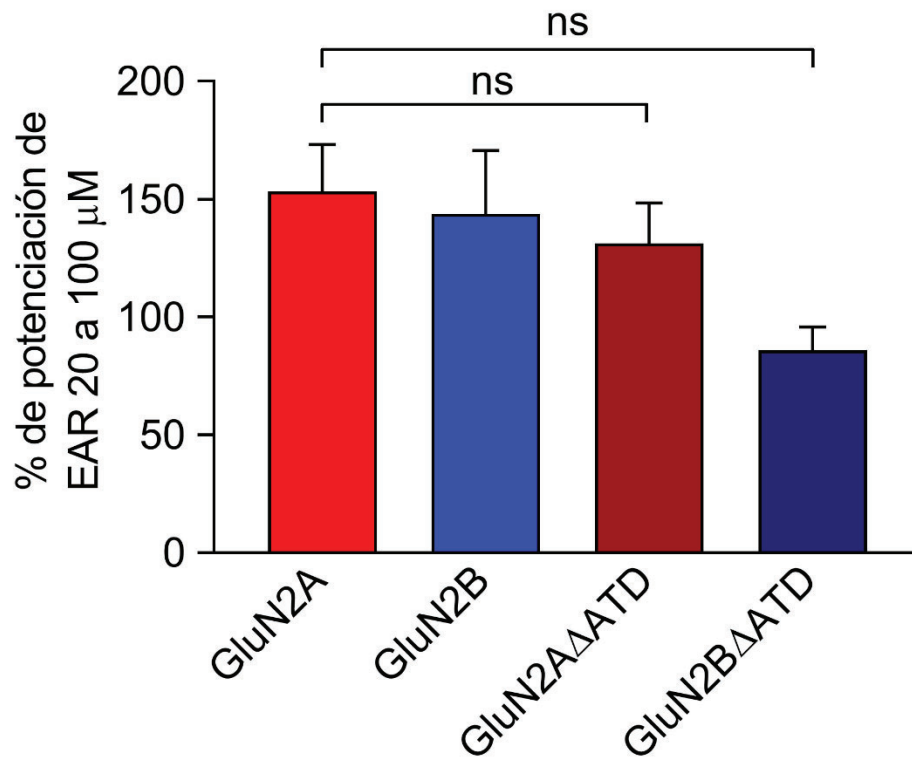


**Figura 4-26:** Registros electrofisiológicos de *patch-clamp* con el péptido EAR-20 sobre NMDARs GluN1-GluN2A $\Delta$ ATD.



**Figura 4-27:** Registros electrofisiológicos de *patch-clamp* con el péptido EAR-20 sobre NMDARs GluN1-GluN2B $\Delta$ ATD.

En cuanto al efecto de EAR-20 sobre los NMDARs ensamblados con las subunidades GluN2 desprovistas de los ATDs, se encontró que 100  $\mu$ M de EAR-20 potencia las respuestas de los agonistas en los receptores GluN1-GluN2A $\Delta$ ATD (figura 4-26) y GluN1-GluN2B $\Delta$ ATD (figura 4-27). Además, la actividad PAM de 100  $\mu$ M de EAR-20 sobre GluN1-GluN2A $\Delta$ ATD y GluN1-GluN2B $\Delta$ ATD (figura 4-28) no presento diferencias estadísticamente significativas a las condiciones *wt* (one-way ANOVA,  $P > 0.05$ ).

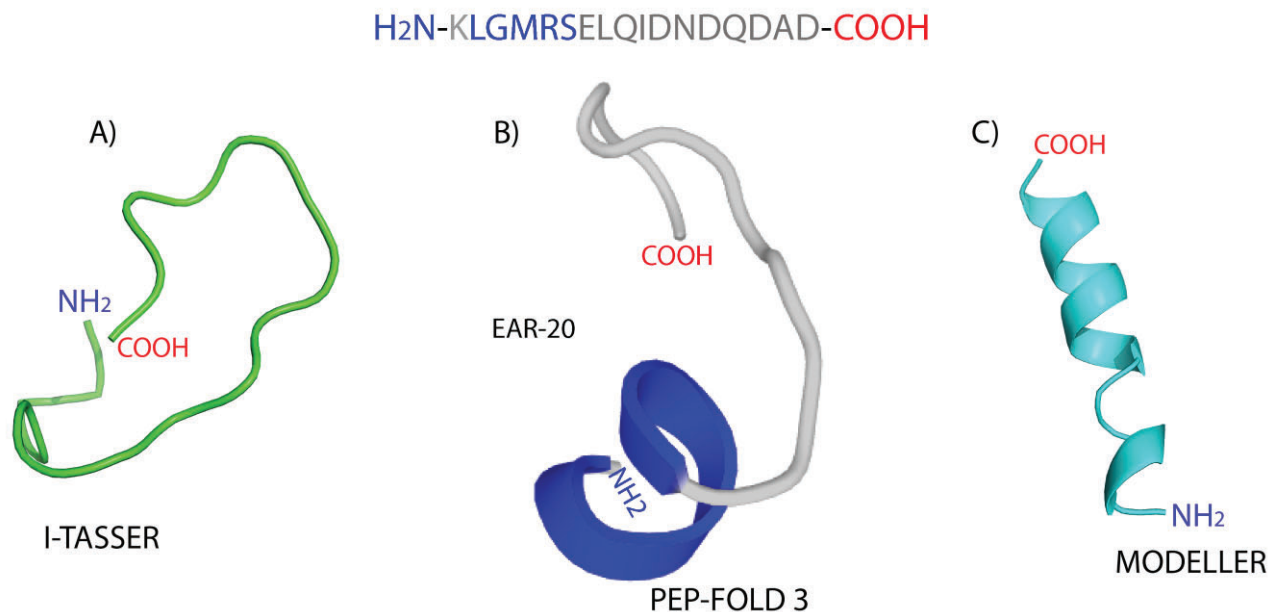


**Figura 4-28:** Cuantificación de la actividad PAM de 100  $\mu$ M de EAR-20 sobre células HEK-293T transfectadas con los NMDARs *wt* (GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B) y mutados (GluN1-GluN2A $\Delta$ ATD y GluN1-GluN2B $\Delta$ ATD). Se registraron 14 células para GluN1-GluN2A, 14 células para GluN1-GluN2B, 6 células para GluN1-GluN2A $\Delta$ ATD y 10 células para GluN1-GluN2B $\Delta$ ATD cada una por triplicado. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  SEM de todos los resultados por cada condición. **ns** indica que el efecto de 100  $\mu$ M de EAR-20 sobre GluN1-GluN2A $\Delta$ ATD y GluN1-GluN2B $\Delta$ ATD no fue significativamente diferente de las condiciones *wt* (one-way ANOVA,  $P > 0.05$ ).

### 4.3.2 Ensayos de *docking* molecular entre el EAR-20 y el NMDAR

#### 4.3.2.1 Modelamiento de la estructura del péptido EAR-20

El modelamiento de la estructura del péptido EAR-20 para los estudios de *docking* se realizó mediante los programas bioinformáticos I-Tasser, pep-fold 3 y modeller, en la figura 4-29 se muestra el modelo de estructura más probable arrojado por cada programa para EAR-20.



**Figura 4-29:** Modelos predichos de la estructura del péptido EAR-20. **A)** Modelo de EAR-20 predicho por la herramienta bioinformática I-Tasser. **B)** Modelo de EAR-20 predicho por la herramienta bioinformática Pep-fold 3. **C)** Modelo predicho por la herramienta bioinformática Modeller.

Tras la obtención de los tres posibles modelos tridimensionales del péptido EAR-20, se realizaron análisis energéticos y estructurales de éstos, con el propósito de evaluar qué estructura de las predichas por estos tres programas bioinformáticos era la mejor para ser utilizada en los estudios de Docking. Estos resultados se obtuvieron en función de sus puntuaciones en RMSD (*Root-mean-square deviation*, de sus siglas en inglés) o DOPE (Discrete Optimized Protein Energy, de sus siglas en inglés) (Kufareva and Abagyan, 2012) (Shen and Sali, 2006). La función RMSD es una medida de las diferencias que existen entre la distancia media de cada uno de los átomos que compone el péptido EAR-20 con respecto a la plantilla (proteína con la que comparte cierta homología) utilizada para el modelamiento, lo que permite identificar el nivel de parecido geométrico entre las dos estructuras.

En cuanto al DOPE *score* este es un potencial estadístico dependiente de la distancia atómica, calculado a partir de una muestra de estructuras de proteínas nativas y se basa enteramente en la teoría de la probabilidad. Éste se basa en un estado de referencia mejorado que corresponde a átomos no interactuantes en una esfera homogénea con un radio dependiente de la estructura nativa (plantilla utilizada), por lo tanto, representa la

forma finita y esférica de las estructuras nativas. De este modo, el DOPE *score* se utiliza para evaluar la energía del modelo de la proteína generado a través de muchas interacciones por Modeller (Shen and Sali, 2006).

### 4.3.2.2 Docking molecular entre el péptido EAR-20 y el NMDAR

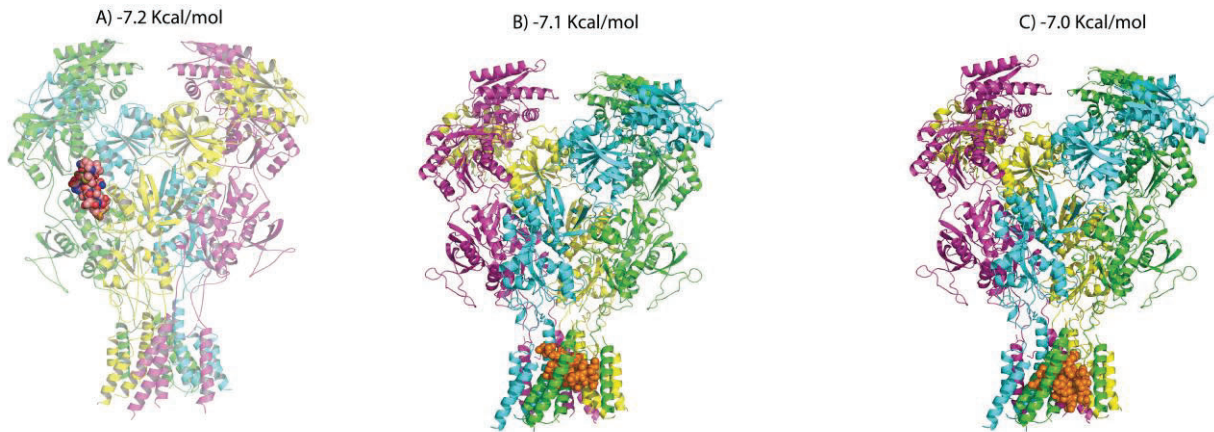
Los ensayos de *docking* molecular se realizaron como se describió en el apartado de metodología. Es importante mencionar que los resultados de un *docking* son expresados en términos de energía libre de unión (Kcal/mol), por lo tanto, cuanto más negativo sea este valor, mayor será la afinidad del péptido EAR-20 por el NMDAR. Inicialmente se llevó a cabo un *docking* ciego, donde se dirigió el péptido sobre todo el NMDAR, con el objetivo de identificar regiones del NMDAR con mayor afinidad hacia EAR-20 (*vina score*). Los resultados se muestran en la tabla 4-4.

Vina score (Kcal/mol)	Tamaño de la cavidad (Å)
-7.2	1757
-7.1	1796
-7	2512
-5.8	4770
-5.4	1954

**Tabla 4-4:** Cavidades o regiones del NMDAR con mayor afinidad hacia EAR-20. En azul se resaltan las cavidades que presentaron mayor afinidad con péptido EAR-20.

En la tabla 4-4 se resalta en color azul las regiones del NMDAR donde la interacción con EAR-20 presentó mayor afinidad (-7.2, -7.1 y -7.0 Kcal/mol), la ubicación exacta de estos sitios de mayor interacción (EAR-20–NMDAR) se muestra con más detalle en la figura 3-30 (A,B y C ).

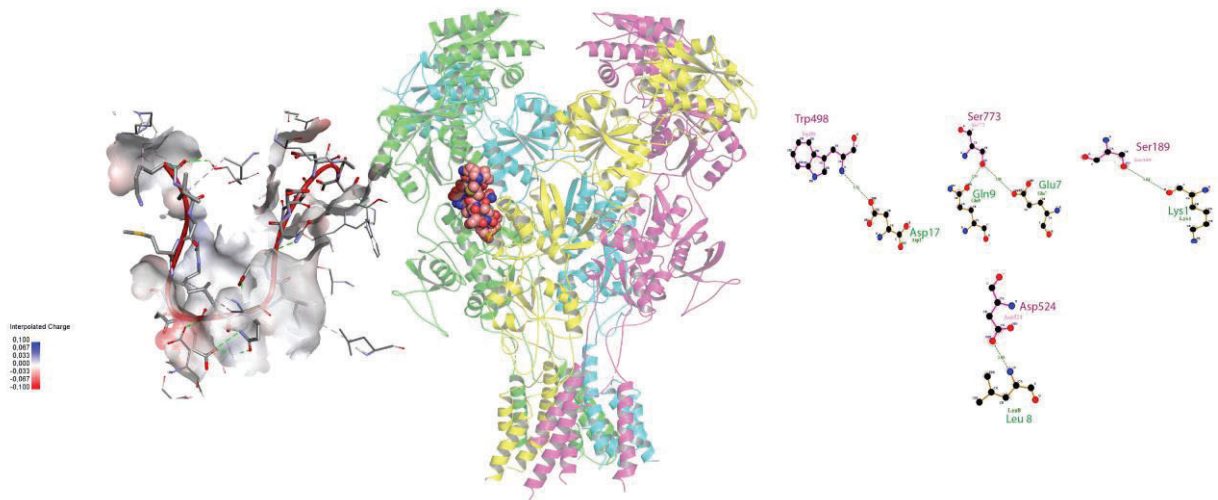




**Figura 4-30 :** Resultados del *docking* ciego. A,B y C, Cavidades o regiones del NMDAR donde la interacción con EAR-20 presento mayor afinidad.

Al analizar los sitios de mayor interacción entre EAR-20–NMDAR, se encontró que estos están localizados en dos regiones del NMDAR : a) Entre los LBDs de las subunidades GluN1 y GluN2B, región que se encuentra en la parte extracelular del NMDAR (figura 4-30 A) y B) los dominios TMDs, región que se localiza en la parte intracelular del NMDAR que se encuentra ingerida en la bicapa lipídica de la membrana plasmática (figura 4-30 B y C). Sin embargo, debido a que el péptido EAR-20 en principio no es capaz de atravesar la membrana celular y que no se ha descrito que moléculas tan grandes como EAR-20 se puedan unir en esta región localizada entre los TMDs y produzcan una actividad PAM (He *et al.*, 2019) , se decidió descartar estos dos sitios para realizar los estudios de *docking*.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, y los resultados electrofisiológicos realizados con los NMDARs sin ATDs, se decidió realizar el *docking* molecular sobre la cavidad ubicada entre los dominios LBDs de las subunidades GluN1 y GluN2B. Esta región es una buena candidata puesto que presentó los mejores resultados de afinidad con EAR-20 (-7.2 Kcal/mol) en la simulación del *docking* ciego. Además, esta región ha sido descrita en muchos estudios como clave para la actividad PAM (Esmenjaud *et al.*, 2019b). Los resultados de *docking* que se muestran en la figura 4-31, predicen que la serina 773 (S773) puede ser un residuo importante para la unión del péptido EAR-20, ya que este interactúa según los estudios *in silico* con dos residuos de EAR-20, la Glutamina 9 (Gln 9) y el Glutamato 7 (Glu 7), por lo que este residuo sería un buen candidato para ser modificado mediante mutagénesis dirigida, y posterior validación mediante ensayos electrofisiológicos de este potencial sitio de unión para el péptido EAR-20.



**Figura 4-31:** Resultados de Docking .Residuos importantes para la unión del péptido EAR-20.

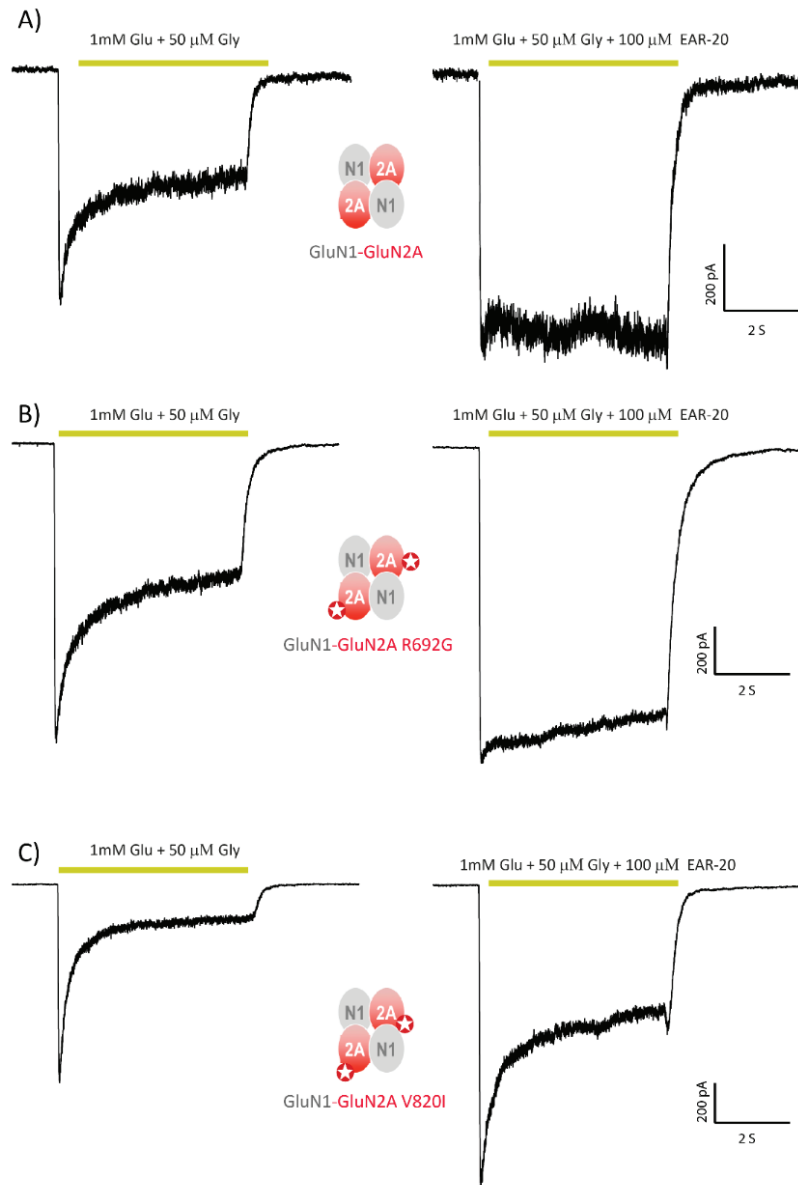
### 4.3.3 Validación del potencial sitio de unión de EAR-20

Con el doble propósito de indagar sobre el posible sitio de unión del péptido EAR-20 sobre el NMDAR, y determinar el posible efecto terapéutico de EAR-20 sobre patologías que involucran la hipofunción del NMDAR, se realizaron mutaciones de residuos específicos. En primer lugar, se realizó la mutación de un residuo del di-heterómeros GluN1(S773A)-GluN2B que según los estudios de docking puede ser un punto de interacción importante para la unión de EAR-20. En segundo término se mutaron residuos presentes en pacientes con GRINpatias, las cuales provocan, acorde con estudios previos, la hipofunción del NMDAR (Soto *et al.*, 2019). Para ello se realizó mutagénesis dirigida de los residuos que producen esta hipofunción sobre los di-heterómeros del NMDAR ensamblados con GluN1-GluN2A ( V820I y R692G ) o GluN1-GluN2B (P553T) ( Swanger *et al.*, 2016; Fedele *et al.*, 2018; Elmasri *et al.*, 2022).

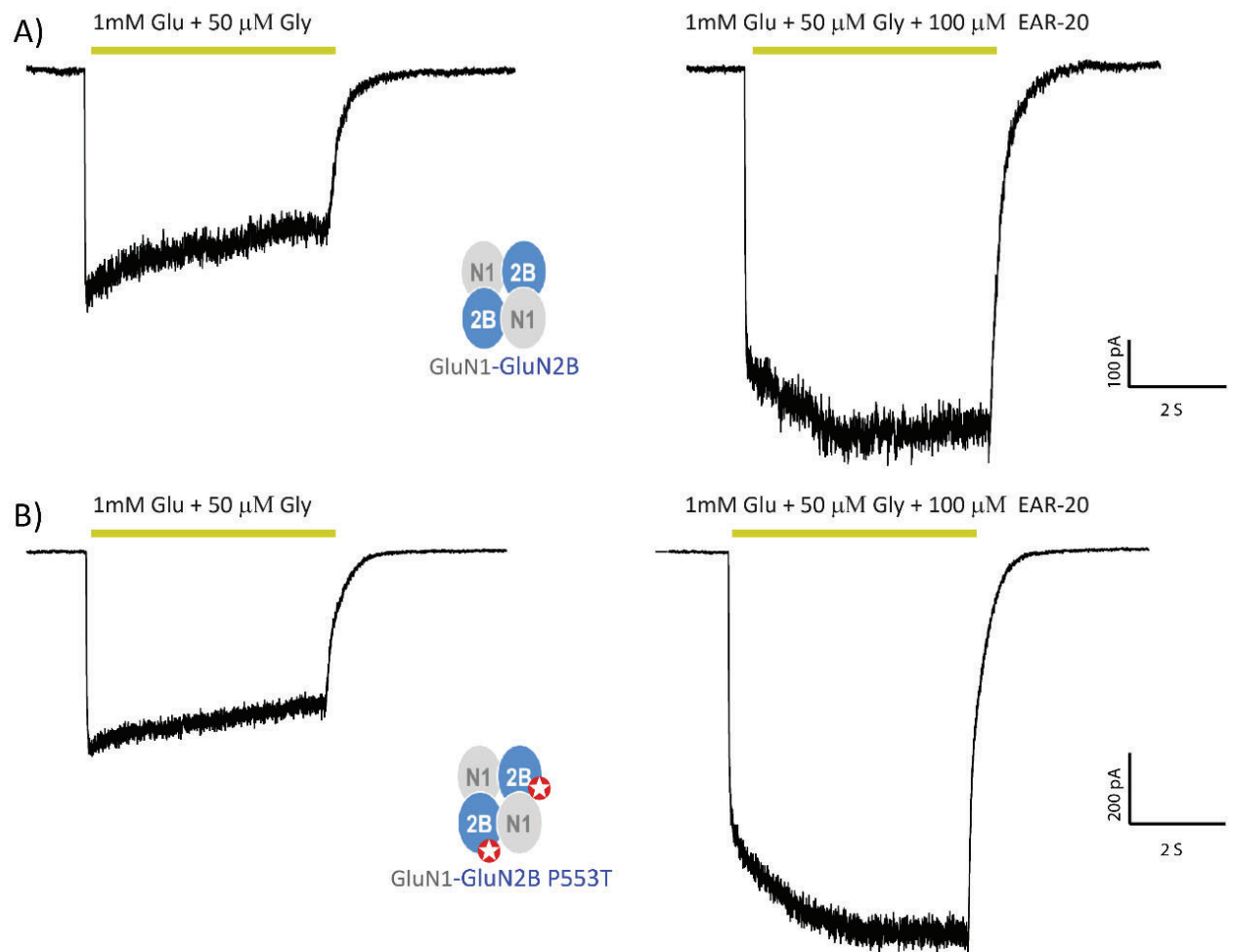
#### 4.3.3.1 Registros electrofisiológicos con EAR-20 sobre NMDARs con mutaciones puntuales

Tras la confirmación que el DNA contenía las mutaciones de los residuos a estudiar en cada subunidad, se procedió a llevar a cabo los experimentos electrofisiológicos funcionales. Los registros electrofisiológicos de *patch-clamp* en la configuración *whole cell* con las mutaciones de interés se muestran en las figuras 4-32,4-33 y 4-34, las cuales están

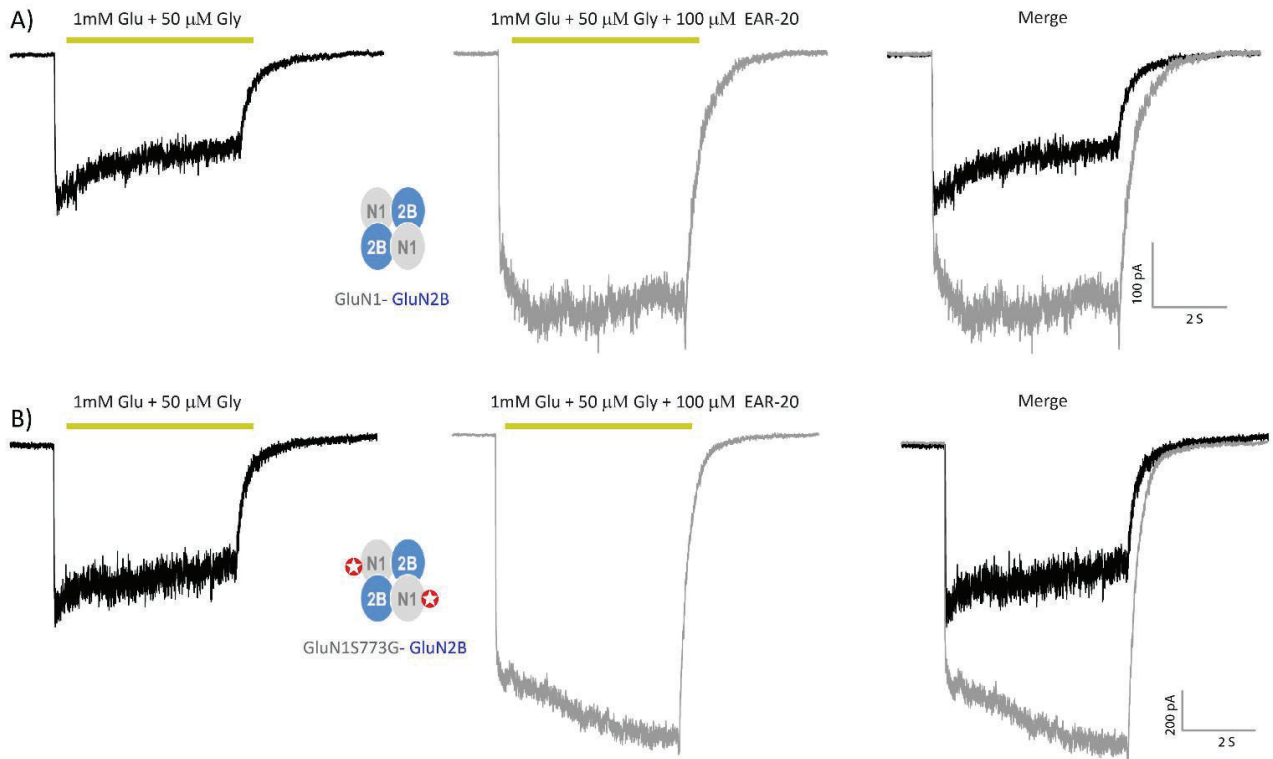
organizados en correspondencia con el tipo de subunidad (GluN2A, GluN2B o GluN1) a la que afecta la mutación.



**Figura 4-32:** Ensayos electrofisiológicos realizados con 100  $\mu\text{M}$  de EAR-20 sobre HEK-293T transfectadas con subunidades mutadas que producen hipofunción del di-heterómero GluN1-GluN2A. **A)** Actividad PAM de 100  $\mu\text{M}$  de EAR-20 en el di-heterómero GluN1-GluN2A *wild-type*; se analizaron 14 células. **B)** Actividad PAM de 100  $\mu\text{M}$  de EAR-20 sobre GluN1-GluN2A R692G; se analizaron 10 células. **C)** Actividad PAM de 100  $\mu\text{M}$  de EAR-20 sobre GluN1-GluN2A V820I; se analizaron 5 células.

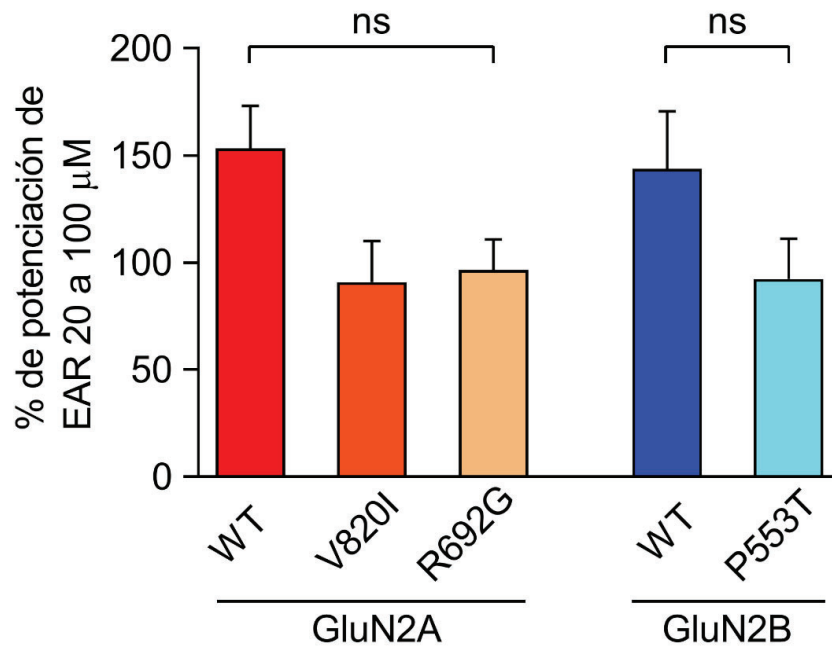


**Figura 4-33:** Ensayos electrofisiológicos realizados con 100 μM de EAR-20 sobre HEK-293T transfectadas con subunidades mutadas que producen hipofunción del di-heterómero GluN1-GluN2B. **A)** Actividad PAM de 100μM de EAR-20 en el di-heterómero GluN1-GluN2B *wild-type* (se analizaron 14 células). **B)** En GluN1-GluN2B P553T (se analizaron 11 células).



**Figura 4-34:** Efecto de EAR-20 sobre HEK-293T transfectadas con las subunidades GluN1 (S773G). **A)** Actividad PAM de 100μM de EAR-20 sobre el di-heterómero GluN1-GluN2B *wild-type* (se analizaron 14 células). **B)** Sobre GluN1S773G-GluN2B (se analizaron 5 células).

Como se puede observar en la figura 4-35, las corrientes del NMDAR con las mutaciones puntuales que producen su hipofunción, son potenciadas por la aplicación simultanea de agonistas más 100  $\mu\text{M}$  de EAR-20.



**Figura 4-35:** Registros electrofisiológicos con EAR-20 sobre NMDARs con mutaciones puntuales encontradas en pacientes con GRINpatias que causan hipofunción del receptor. **ns** indica que el efecto de 100  $\mu\text{M}$  de EAR-20 sobre los NMDARs ensamblados con las subunidades mutadas no mostró diferencias estadísticamente significativas a las condiciones wt (**one-way ANOVA,  $P > 0.05$** ). En todas las condiciones se registraron más de 5 células ( $n > 5$ ) cada una por triplicado.



## 5. Discusión

El descubrimiento de nuevos fármacos es un proceso costoso, tedioso y que requiere mucho tiempo. Por esta razón la implementación de estudios *in silico* mediante el uso de herramientas computacionales que permitan realizar estudios de estructura-función con miras a la identificación, diseño y posterior evaluación de compuestos con potencial actividad farmacológica, ha ganado gran popularidad en los últimos años (Geldenhuis *et al.*, 2006). Uno de los campos donde más se ha investigado recientemente, ha sido en el diseño de fármacos con actividad PAM hacia los NMDARs, los cuales se han convertido en importantes blancos terapéuticos por las implicaciones que tienen sobre los procesos neurofisiológicos claves para el aprendizaje y la memoria (Kysilov *et al.*, 2022). Los compuestos con actividad PAM hacia los NMDARs exhiben las siguientes características: a) incrementan las respuestas de los agonistas, b) son generalmente selectivos hacia algunos subtipos del NMDAR, c) presentan diferentes mecanismos de acción como por ejemplo aumentar la probabilidad de apertura del canal ( $P_o$ ) o incrementar la potencia del Glu (Geoffroy, Paoletti and Mony, 2021). Estas características farmacológicas hacen de los PAMs unos compuestos muy interesantes y, por lo tanto, la búsqueda y posterior identificación de sitios alostéricos que modulen la actividad del NMDAR, es una estrategia para tener en cuenta dentro del diseño de fármacos dirigidos hacia el tratamiento de la hipofunción de este receptor. En línea con lo anterior, en esta tesis doctoral se identificó, sintetizó y evaluó un nuevo compuesto (péptido EAR-20) que mostro un efecto PAM sobre los NMDARs, los resultados de este estudio se discuten a continuación.



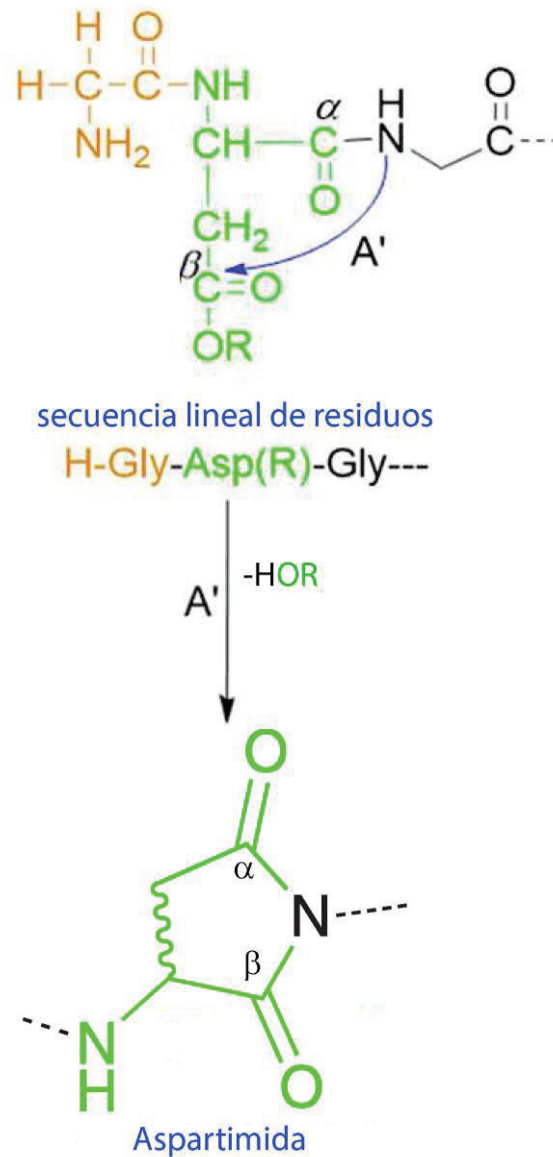
## 5.1 Síntesis péptido EAR-20

Como se mostró en el capítulo de resultados, tras las diferentes etapas de síntesis y purificación del péptido EAR-20 (figura 4-1B), en adición al péptido esperado (1948.231g/mol), se obtuvo una especie de menor peso molecular (1930.280 g/mol). Al calcular la diferencia entre los pesos moleculares de estas dos especies, se encontró que la diferencia corresponde con un peso molecular de 17.951g/mol. Al relacionar esta deleción con los pesos moleculares de los residuos de la secuencia de EAR-20, se puede inferir que dicha deleción no corresponde con el peso molecular de ningún residuo de EAR-20, ya que el residuo con menor peso molecular es la glicina (G), y esta restaría un peso molecular de 57 g/mol. Esta especie de menor peso molecular podría ser producto de las siguientes causas: **a)** deshidratación de algún residuo durante algún paso de la síntesis, **b)** reacción de oxido-reducción en alguno de los residuos, y **c)** reacciones entre los residuos de la secuencia de EAR-20.

En cuanto a la posibilidad de que uno de los aminoácidos haya sufrido una reacción de oxido-reducción, se ha reportado que los residuos más propensos a sufrir reacciones de oxidación son la cisteína (C), el triptófano (W) y la metionina (M) (Novabiochem, 2012). Teniendo en cuenta que la secuencia de EAR-20 no tiene ningún residuo de C y W, este análisis se centró solo en el residuo de M ubicado en la posición 4 del péptido EAR-20. En cuanto a la oxidación del residuo de M se ha descrito que este puede oxidarse durante la etapa de desanclaje a sulfóxido de la metionina (Huang and Rabenstein, 1999), por lo tanto, el peso molecular del péptido se incrementaría en 16 g/mol, como consecuencia de la unión del oxígeno al azufre de la M (Norris *et al.*, 1971). Debido a que no se observó en el espectro de masas ningún incremento de masa que corresponda con este valor, esta teoría de la oxidación de la metionina durante la síntesis de EAR-20 se descartó.

Finalmente, en cuanto a la hipótesis de que hubiera ocurrido una reacción entre los residuos de la secuencia de EAR-20, se ha descrito que una de las reacciones secundaria más comunes durante la SPPS/ Fmoc cuando se cuenta con residuos de ácido aspártico (Asp, D) en la secuencia, es la formación de aspartimida (figura 5-1) (Behrendt, White and Offer, 2016; Samson *et al.*, 2019). Se ha determinado que el grado de formación de aspartimida depende en gran medida de la naturaleza del residuo que se encuentra

después del residuo de ácido aspártico (Lauer, Fields and Fields, 1995) siendo las secuencias más propensas a la formación de aspartimida las siguientes: **a)** Asp-Gly, **b)** Asp-Asn, **c)** Asp-Asp, **d)** Asp-Arg, **e)** Asp-Ser/Thr y **f)** Asp-Cys. El caso más grave sucede cuando se encuentra en la secuencia a sintetizar el par Asp-Gly (Behrendt, White and Offer, 2016 ;Samson *et al.*, 2019) (Tabla 5-1).



**Figura 5-1:** Formación de aspartimida. secuencia Asp(R=tBu)-Gly. Tomado y modificado de Samson *et al.* 2019 (Samson *et al.*, 2019).

Asp-Xaa	Sensibilidad a formar aspartimidias
Gly	+++++
Asn(Trt)	+++
Asp(OtBu)	++
Arg(Pbf)	++
Ser/Thr	++
Cys(Acm)	++
Cys(Trt)	+
Thr(tBu)	+
Ala	+

Alta Sensibilidad (+++++)      Baja Sensibilidad (+).

**Tabla 5-1:** Secuencias Asp-Xaa sensibles a formar aspartimidias. Tomado y modificado de Behrendt *et al.* 2016 (Behrendt, White and Offer, 2016).

Al analizar la secuencia de residuos de EAR-20 encontramos que esta contiene cuatro residuos de Asp en las posiciones 11,13,15 y 17, y estos residuos tienen las siguientes secuencias Asp-Xaa: **a)** Asp-Asn (Trt) **b)** Asp-Gln (Trt) y **c)** Asp-Ala. Por lo tanto, al contrastar esta información con la mostrada en la tabla 5-1, podríamos deducir que en la síntesis de EAR-20 se pudo desencadenar una reacción colateral que dio como resultado la formación de aspartimida (Tam, Riemen and Merrifield, 1988; Behrendt, White and Offer, 2016). Esta afirmación se basa en el hecho, de que la formación de aspartimida depende en gran medida de la naturaleza del aminoácido que sigue al residuo de ácido aspártico en nuestro caso el Asn (Trt), una secuencia con alta sensibilidad a la formación de Aspartimida en condiciones acidas como las utilizadas en el desanclaje de péptido EAR-20 (tabla 5-1) (Lauer, Fields and Fields, 1995). Lo anterior, se puede confirmar en el espectro de masas de EAR-20 puro (figura 4-2B), donde se observa un pico de menor intensidad con una pérdida de masa de aproximadamente 18 g/mol (Samson *et al.*, 2019), la cual correspondería a la pérdida de un oxígeno (O= 16 g/mol) y un hidrogeno (H= 1g/mol) de la cadena acida (R= COOH) del Asp, y un hidrogeno (H= 1g/mol) del  $\alpha$ -NH de la Asn (Figura 5-1) (Samson *et al.*, 2019). Además, esto también explicaría por qué no se pudo

purificar completamente el péptido EAR-20 por RP-HPLC (figura 4-2A), ya que se ha descrito que, si bien en muchos casos las aspartimidias generadas mediante esta reacción secundaria, pueden ser fácilmente separadas del péptido diana mediante RP-HPLC, en otros casos, son casi imposibles de eliminar ya que suelen tener el mismo tiempo de retención que el péptido de interés (Ruczynski *et al* 2007; Behrendt, White and Offer, 2016 ; Neumann *et al.*, 2020).

En cuanto a los modelos estructurales de EAR-20 generados por las herramientas bioinformáticas Pep-fold 3 (figura 4-3A) y PEDstrMOD (figura 4-3B) se encontró que estos presentan similitudes estructurales en la región comprendida entre el E7 y el C-terminal, donde los dos programas simularon una estructura secundaria de tipo *random coil*. Lo cual coincide con el hecho de que esta región está constituida principalmente por los residuos aspartato (D), glutamato (E), Alanina (A), Leucina (L) e isoleucina (I), que presentan según muchos estudios alta propensión a formar estructuras secundarias de tipo *random coil*. Una situación muy diferente se observó en la región comprendida entre el N-terminal y el residuo serina (Ser, S) en la posición 6, donde los modelos generados por Pep-fold 3 (figura 4-3A) y PEDstrMOD (figura 4-3B) mostraron una pequeña alfa y un *random coil* respectivamente. Estas diferencias pueden ser atribuidas a que la secuencia de EAR-20 en esta región está constituida por residuos que han sido clasificados tanto como formadores de alfa-hélices como de *random coil*. Aunque toca tener cuidado con estas interpretaciones ya que se han descrito casos donde no se evidencia ninguna relación entre la naturaleza química de la cadena lateral del residuo, y la existencia de un residuo en un tipo de estructura secundaria en particular. Un ejemplo de esto se puede ver con los residuos E y D, los cuales están químicamente relacionados (en ocasiones se pueden intercambiarse sin afectar la actividad de una proteína) y a pesar de esto es mucho más probable encontrar el primero en alfa-hélices y el segundo en *random coil*, estas diferencias se han atribuido al hecho de que las propiedades de las cadenas laterales pueden afectar el empaquetamiento y, por lo tanto, las características locales como estructura secundaria. A pesar de esto los anteriores hallazgos están en directa concordancia con los resultados de estructura secundaria que ha sido descrita para los péptidos EAR-16 y EAR-18, para los cuales se ha calculado que aproximadamente el 50% de su estructura puede adoptar una conformación helicoidal (Reyes *et al.*, 2017). Estos resultados no sorprenden, ya que estos péptidos (EAR-16 y EAR-18) tienen la misma longitud de residuos, y presentan una alta identidad de secuencia con EAR-20.

En relación con el bajo rendimiento obtenido en la síntesis de EAR-20 (14.6%) este fue consecuencia de algunas dificultades que se presentaron en el proceso de precipitación de EAR-20, ya que en esta etapa se observó que la solución de éter frío quedaba turbia tras cada paso de centrifugación, este hecho se pudo presentar como consecuencia de una insuficiente refrigeración. Sin embargo, éste no fue el único inconveniente, debido a que también se tuvieron que realizar varias pruebas preliminares para optimizar las condiciones de separación en RP-HPLC (modalidad analítica y semipreparativa), en las cuales se utilizó gran cantidad de péptido, que al final terminó afectando el porcentaje de rendimiento de la síntesis de EAR-20. Pero a pesar de estas dificultades se logró obtener una considerable cantidad de EAR-20 con una pureza por encima del 95%, la cual fue adecuada para la evaluación de EAR-20 mediante ensayos electrofisiológicos.

## 5.2 Efecto agonista del péptido EAR-20

En la figura 4-4 se mostró el efecto agonista de EAR-20 sobre células HEK-293T transfectadas con los di-heterómeros GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B, allí se puede ver que el péptido EAR-20 presenta una pequeña actividad agonista ya que es capaz de abrir el canal del NMDAR en ausencia de los agonistas naturales. Este efecto mostrado por EAR-20 es muy interesante, ya que no existe en la literatura ningún compuesto agonista que sea capaz de activar los NMDARs en ausencia de glicina, su coagonista principal, a pesar de que se ha demostrado que compuestos como el homoquinolinato (Erreger *et al.* 2005), (2S,4R)-4-metil-glutamato y el L-homocisteato pueden activarlos en presencia de glicina (Erreger *et al.*, 2007), y compuestos como el ácido 1-aminociclobutano-1-carboxílico (Inanobe, Furukawa and Gouaux, 2005) y algunas moléculas derivadas de las estructuras de Gly y de D-serina, pueden activarlo en presencia de Glu (Maolanon *et al.*, 2017). En esta misma línea, también se ha descrito que algunas isoformas del péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ 1-42) son capaces de activar el NMDAR en presencia de Gly y provocar la entrada de Ca<sup>2+</sup> a las neuronas desencadenando procesos de excitotoxicidad (Alberdi *et al.*, 2010).

En relación con lo anterior, cuando se evaluó si el efecto de EAR-20 podría verse alterado por la aplicación simultánea de EAR-20 con Glu (figura 4-5) o Gly (figura 4-6), se encontró que la aplicación de solo Glu (en una concentración saturante de 1 mM) sin adición de Gly produce la activación del NMDAR, este efecto ha sido reportado en otros estudios donde

se ha atribuido este fenómeno a bajos niveles de Gly contaminante en la solución de registro (Yi et al., 2020). De acuerdo con lo anterior Chen et al. reportaron en 2019 que concentraciones de glicina en el orden de los nM son suficientes para desencadenar una pequeña respuesta del NMDAR (Chen et al., 2019). En tanto la aplicación de EAR-20 + Gly indujo una respuesta del 40% en el NMDAR (figura 4-6), que a diferencia de lo que ocurrió tras la aplicación de solo Glu (figura 4-5), esta estimulación del NMDAR con Gly + solución extracelular no generó ningún tipo de respuesta, lo cual está en concordancia con lo que han encontrado y descrito otros investigadores (Chen *et al.*, 2019). Estos resultados podrían sugerir de alguna manera que EAR-20 probablemente no estaría presentado ningún tipo de interacción con el LBD de la subunidad GluN1 del NMDAR, ya que la aplicación simultánea de Glu + EAR-20 no generó ningún tipo de efecto sobre la actividad del NMDAR (figura 4-5), situación muy diferente a la que se observó cuando se aplicó Gly + EAR-20 (figura 4-6), donde esta actividad presuntamente se podría relacionar con una posible interacción entre EAR-20 y el LBD de la subunidad GluN2 del NMDAR.

Por otro lado, en la figura 4-12 se puede inferir que tras la aplicación de 250  $\mu$ M de EAR-20 se logra el efecto máximo en la corriente del NMDAR, y, por ello, no se observa un incremento en la corriente, cuando se estimularon las células con mayores concentraciones de EAR-20.

### 5.3 Efecto PAM del péptido EAR-20

La evaluación de la actividad PAM de EAR-20 (figura 4-15) mostró que la aplicación de EAR-20 promueve una menor desensibilización de los NMDARs comparado con los NMDARs que son solo estimulados con agonistas fisiológicos, donde se observa una mayor desensibilización. También se puede observar un aumento transitorio en la corriente del NMDAR cuando la solución que contiene EAR-20 es lavada con solución control, este fenómeno ha sido previamente descrito en la literatura cuando se evaluaron otros compuestos con actividad PAM (Chopra, Monaghan and Dravid, 2015; Chopra *et al.*, 2017). Aunque no se conoce con certeza a que se debe este aumento transitorio en la corriente de los NMDARs, Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2019), en 2019 realizaron algunos experimentos con el propósito de conocer un poco más sobre los diferentes estados transicionales involucrados en la desensibilización del NMDAR, mediante los que se logró demostrar que ciertos compuestos como los iones tetrapentilamonio (TpentA) tras ser lavados en los ensayos electrofisiológicos promovían un cambio de conformación del

NMDAR desde el estado desensibilizado al estado activo; por lo tanto, generando un aumento transitorio en la corriente producida por el NMDAR en los registros electrofisiológicos. Estos hallazgos nos permitieron hipotetizar que el péptido EAR-20 tras ser lavado, podría estar promoviendo un cambio de conformación del NMDAR desde un estado desensibilizado al estado activo, una situación totalmente diferente a lo que ocurre cuando se lavan los agonistas fisiológicos, en la que se observa un cambio conformacional del NMDAR desde el estado desensibilizado al estado cerrado (Tajima *et al.*, 2016).

Comparando la metodología implementada en la evaluación del efecto PAM de EAR-20 con la utilizada por Chopra *et al.* (Chopra *et al.*, 2015; Chopra *et al.*, 2017), en la evaluación de los compuestos sulfato de pregnenolona y el UBP684, podemos decir que la actividad PAM también puede verse influenciada por tipo de modalidad de *whole cell* (no perforado o perforado) utilizado. En Chopra *et al.*, los registros electrofisiológicos realizados en configuración *whole cell* “no perforado” no permitieron identificar ninguna actividad PAM propia en estos compuestos, contrario a lo que sucedió cuando realizaron la evaluación de estos compuestos en modo *whole cell* “perforado” donde encontraron que estas moléculas potenciaban las corrientes GluN1-GluN2A hasta un 200%. De acuerdo con lo anterior, podríamos hipotetizar que EAR-20 podría presentar una mayor actividad PAM, si este fuera evaluado bajo condiciones de *whole cell* “perforado”, ya que se ha descrito que la concentración del medio intracelular intacto sin diluciones, puede variar considerablemente los resultados electrofisiológicos debido a que estos procesos de dilución propios de la configuración de *whole cell* clásica, pueden afectar los procesos de fosforilación o producir modificaciones en las vías de señalización que en conjunto afectan el funcionamiento del NMDAR (Chopra *et al.*, 2017).

La baja potenciación observada en neuronas hipocampales en comparación con los di-heterómeros GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B, podría explicarse debido a que en neuronas hipocampales de ratones neonatos y adultos, la población de NMDARs predominante corresponde a los tri-heterómeros GluN1-GluN2A-GluN2B (Rauner and Köhr, 2011), sobre los cuales la actividad PAM de EAR-20 es significativamente menor. Apoyando la anterior observación, está el hecho de que muchos autores han reportado que las propiedades farmacológicas como desensibilización por glutamato y la modulación alostérica exhibida por los tri-heterómeros GluN1-GluN2A-GluN2B es muy diferente a la observada en los di-



heterómeros GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B (Hansen *et al.*, 2014; Stroebel, Casado and Paoletti, 2018; Gibb, 2022).

La diferencial actividad PAM mostrada por EAR-20 sobre los di-heterómeros ensamblados con las subunidades GluN2A, GluN2B y GluN2D con respecto a los di-heterómeros GluN2C, puede ser explicada por que algunas regiones de la subunidad GluN2C como la interfase entre los dominios LBD y los *linkers* ATD-LBD se encuentran menos conservadas en comparación con las otras subunidades GluN2, la cual podría explicar las diferencias del efecto del péptido sobre diferentes subunidades. En esta línea, se ha observado diferencias en cuanto a la selectiva actividad PAM del compuesto PYD-106 hacia la subunidad GluN2C, y nula hacia los otros di-heterómeros de los NMDARs (Khatri *et al.*, 2014). En este sentido, se ha identificado que el sitio de unión de PYD-106 sobre la subunidad GluN2C que produce esta selectiva actividad PAM, está ubicado en la región comprendida entre los linkers ATD-S1, que como se mencionó anteriormente, se encuentra muy poco conservada dentro de las subunidades GluN2, y especialmente entre GluN2C y las demás GluN2 (Khatri *et al.*, 2014). De acuerdo con las anteriores observaciones, se podría hipotetizar que posiblemente algunos aminoácidos ubicados en la región entre los linkers ATD-S1 de las subunidades GluN2A, GluN2B y GluN2D, los cuales están conservados o tienen alta similaridad química dentro las tres subunidades, podrían estar involucrados en la unión de EAR-20. Esta selectividad específica de la actividad PAM sobre subunidades es común para los NMDARs. Existen otros compuestos PAMs que tienen actividad selectiva hacia un grupo de di-heterómeros en particular, como por ejemplo el compuesto EU1622-14 el cual presenta actividad hacia los NMDARs ensamblados con las subunidades GluN2B, GluN2C y GluN2D, pero no hacia los NMDARs ensamblados con la subunidad GluN2A (Perszyk *et al.*, 2020), o por ejemplo el PTC-174 el cual potencia selectivamente los di-heterómeros GluN2C y GluN2D (Yi *et al.*, 2020).

Debido a esta especificidad sobre subunidades, se abre la posibilidad de que nuevos ligandos puedan ser desarrollados para que actúen sobre estos bolsillos o sitios de unión, y produzcan una actividad dirigida hacia un tipo de subunidad GluN2 en particular. Una región muy importante que se puede explorar son los linkers ATD-S1, los cuales permite la unión entre los dominios ATDs y LBDs, y, además, están bien posicionados para influir en una amplia gama de propiedades del canal como: la afinidad por los agonistas, el grado de desactivación y la probabilidad de apertura entre otras.



## 5.4 Posible sitio de unión del péptido EAR-20

Se ha descrito que la interfase entre dominios LBD de las subunidades del heterotetrámero del NMDAR es una región clave para la unión de compuestos con actividad PAM, ya que la unión de moléculas en esta región puede producir cambios conformacionales que modulan el gating en los NMDARs (Bledsoe et al., 2019). Por lo que descartar potenciales sitios de unión del péptido EAR-20 en el NMDAR se convierte en una tarea importante. En relación con lo anterior, en los experimentos realizados sobre células HEK 293T transfectadas con los NMDARs *wt* (GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B) y los que contenían la delección de los ATDs (GluN1-GluN2A<sup>ΔATD</sup> y GluN1-GluN2B<sup>ΔATD</sup>), se pudo identificar que la magnitud de las corrientes (de los NMDARs) en las células HEK 293T tras la aplicación de agonistas fueron menores para los NMDARs desprovistos de los ATDs en relación con los *wt*. Este hecho podría ser explicado debido a que los ATDs de los NMDARs parecen ser importantes para el tráfico de los NMDARs a la membrana (Qiu et al., 2009; Horak et al., 2014), y aunque varios estudios han reportado y demostrado que los tetrámeros de los NMDARs desprovistos de los ATDs trafican a la membrana y generan receptores funcionales (Madry et al., 2007), estos estudios se han realizado principalmente sobre células muy grandes como lo son los oocitos (Rachline et al. 2005; Madry et al., 2007) y que por lo tanto, pueden compensar esta deficiencia en el tráfico de los tetrámeros de NMDARs con una expresión muy elevada de receptores funcionales en la membrana celular de los *oocitos*. El hecho que estas células tengan mayor superficie facilitaría el registro de corrientes de mayor magnitud en comparación con las se podrían encontrar sobre las células HEK 293T. Apoyando esta afirmación se encuentra el hecho de que cuando se incrementó el tiempo de transfección en células HEK 293T a 48 horas, se lograron registrar corrientes de mayor magnitud con los NMDARs que carecían de los ATDs.

En cuanto al funcionamiento del canal se determinó que los receptores ensamblados con las subunidades *wt* y las que carecían de un ATD mostraban un comportamiento similar. Lo anterior en relación con lo medido respecto al porcentaje desensibilización del receptor macroscópico (relación entre la corriente medida en el *steady-state* y la corriente máxima) determinado sobre los GluN1-GluN2A ( $60.75 \pm 3.8$  %,  $n=14$ ), GluN1-GluN2A<sup>ΔATD</sup> ( $59.77 \pm$

4.7 %, n=6), GluN1-GluN2B ( $34.25 \pm 5.5\%$ , n=14) y GluN1-GluN2B<sup>AATD</sup> ( $37.21 \pm 4.2\%$ , n=10). Estos hallazgos corresponden con lo encontrado en otros estudios donde se utilizaron los mismos plásmidos y enfoques experimentales parecidos (Smothers, Jin and Woodward, 2013; Marchetti, Baranowska-Bosiacka and Gavazzo, 2014).

En cuanto a los resultados mostrados en la figura 4-28 se podría inferir que los ATDs de los NMDARs, no parecen ser determinantes para la actividad PAM de EAR-20. Estos resultados están en la línea con lo reportado recientemente en la literatura, donde se ha descrito que la actividad PAM no está directamente relacionada con los ATDs de los NMDARs como se creía previamente, si no que, al contrario, está puede darse por la unión de compuestos sobre todos los dominios del NMDAR (Geoffroy, Paoletti and Mony, 2021). En este mismo sentido, se ha identificado la interfase entre los LBDs de los dímeros GluN1-GluN2 como un sitio clave para esta actividad, ya que se ha encontrado que esta región puede estar relacionada con la actividad PAM hacia un subtipo de NMDAR en particular (GluN2A, GluN2B, GluN2C y GluN2D) (Khatri *et al.*, 2014; Hackos *et al.*, 2016 ; Volgraf *et al.*, 2016).

En relación con lo anterior, en la figura 4-29 se muestra un componente importante para los estudios de docking molecular, en esta se puede observar que las simulaciones de estructura para EAR-20 por I-tasser (figura 4-29A) y Pep-fold 3 (figura 4-29B) presentan similitudes estructurales, ya que se puede ver que la estructura del EAR-20 en la región C-terminal está constituida principalmente por un espiral al azar (random coil), mientras que la región N-terminal de EAR-20 presenta una pequeña hélice alfa. Cuando se evaluaron estas dos estructuras mediante la función RMSD, se encontró que los valores de RMSD para los modelos de EAR-20 por I-tasser y Pep-fold 3 eran 3.7 Å y 4.0Å, respectivamente. De acuerdo con estos resultados se decidió descartar el modelo estructural de EAR-20 llevado a cabo por Pep-fold 3. En cuanto al modelo estructural de EAR-20 realizado por Modeller (figura 4-29C), la función DOPE arrojó un valor de -827.311 el cual indica que este es un buen modelo, ya que a menor puntuación DOPE, menor energía libre asociada al modelo, y, por tanto, se espera sea un mejor modelo.

Finalmente, para decidir entre los modelos de EAR-20 determinados por I-tasser y Modeller, se realizó un análisis mediante el gráfico de Ramachandran (Hollingsworth and Karplus, 2010). Como es sabido en una cadena polipeptídica los enlaces N-Cα y Cα-C tienen libre rotación, por lo tanto, estas rotaciones están representadas por los ángulos de

torsión phi ( $\phi$ ) y psi ( $\Psi$ ), respectivamente. En este sentido, si los átomos son considerados como esferas rígidas con dimensiones correspondientes a su radio de van der Waals, los ángulos que causan una colisión entre las esferas correspondientes son considerados como prohibidos y se relacionaran como conformaciones no permitidas de la cadena polipeptídica (Hollingsworth and Karplus, 2010). Los resultados obtenidos mediante el análisis del gráfico de Ramachandran para el modelo de EAR-20 generado por I-tasser mostraron que: el 53% de los residuos de EAR-20 estaban en regiones favorecidas, el 86.7 % de los residuos se ubicaban en regiones permitidas y los residuos metionina 4 y aspártico 13 de EAR-20 se localizaban en regiones prohibidas. Mientras los análisis por Ramachandran para el modelo generado por Modeller arrojaron que: el 93.3 % de los residuos de EAR-20 estaban en regiones favorecidas, el 100 % de los residuos se ubicaban en regiones permitidas y no se localizaba ningún residuo de EAR-20 en regiones prohibidas. Los anteriores resultados, demuestran de alguna manera que la estructura tridimensional de EAR-20 generada por Modeller es más estable y por lo tanto más probable, ya que los ángulos de torsión phi ( $\phi$ ) y psi ( $\Psi$ ) de EAR-20 ubicados en esta disposición espacial no causan colisiones entre los átomos correspondientes, y, por lo tanto, estas rotaciones son consideradas como permitidas. En tanto el docking realizado con la estructura de EAR-20 generada por Modeller que se muestra en la figura 4-31, predijo que la serina 773 (S773) podría ser un residuo importante para la unión del péptido EAR-20, ya que este interactúa según los estudios *in silico* con dos residuos de EAR-20, la Glutamina 9 (Gln 9) y el Glutamato 7 (Glu 7).

Finalmente, al analizar los registros electrofisiológicos realizados con las diferentes mutaciones, podemos observar que las corrientes de todos los NMDARs ensamblados con las diferentes subunidades mutadas son potenciadas por la aplicación simultanea de agonistas más 100  $\mu$ M de EAR-20 (figura 4-32 B y C, figura 4-33B y figura 4-34B). Además, en todos los registros se observó que la aplicación de EAR-20 provoca que el NMDAR experimente muy poca desensibilización en comparación con las condiciones donde solo se aplicó agonistas. Aunque los receptores ensamblados con la subunidad mutada GluN2A V820I son los que presenta mayor desensibilización  $77.02 \pm 4.2$  % (4-10C), siendo incluso muy superior a la que experimenta el receptor *wt* GluN1-GluN2A  $60.75 \pm 3.8$  % (4-10A). Lo anterior, está en concordancia con el hecho de que a los NMDARs que tienen esta mutación se les clasifique como receptores con pérdida de función. En cuanto a la

---

mutación GluN1S773G-GluN2B (4-34B), se puede observar que al aplicarse EAR-20 la corriente del NMDAR se ve potenciada, lo que podría sugerir que posiblemente este residuo no juega un papel clave en la unión de EAR-20, aunque si es cierto que la cinética del NMDAR tras la aplicación del péptido EAR-20 parece ligeramente diferente (4-34B), esto podría estar relacionado con un posible cambio del gating del canal iónico del NMDAR. Lo anterior, parece indicar que estos aminoácidos mutados en NMDAR no están involucradas en la unión del péptido EAR-20. Además, estos resultados suponen una prueba de concepto de que EAR-20 podría ser utilizado en el futuro como un compuesto susceptible de ser evaluado sobre enfermedades producidas por la hipofunción del NMDAR.

## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.1 Conclusiones

- Mediante síntesis en fase sólida se sintetizó aproximadamente 30 mg de péptido EAR-20 con una pureza por encima del 95%. Aunque se observó la formación de aspartimida en la síntesis de EAR-20 (por los múltiples residuos de ácido aspártico que tiene la secuencia) esta reacción colateral no generó grandes problemas en los procesos de síntesis y purificación.
- Los estudios electrofisiológicos funcionales con el péptido EAR-20 mostraron que EAR-20 presenta una pequeña actividad agonista sobre los receptores di-heteroméricos GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B, siendo muy destacado el hecho de que está se presentó en total ausencia de los co-agonistas naturales ( glutamato y glicina). Además, de forma interesante nuestros resultados también mostraron que EAR-20 puede actuar como un compuesto PAM, porque potencia las respuestas del NMDARs a sus agonistas. Aunque EAR-20 exhibió una actividad PAM similar sobre los receptores di-heteroméricos GluN1-GluN2A ,GluN1-GluN2B y GluN1-GluN2D, el efecto modulador sobre los NMDARs di-heteroméricos (GluN1-GluN2C), tri-heteroméricos (GluN1-GluN2A-GluN2B) y los expresados de forma nativa en neuronas piramidales hipocampales fue significativamente menor.
- En cuanto al posible sitio de unión de EAR-20 en el NMDAR se encontró que los ATDs del NMDAR no son importantes para la actividad PAM de EAR-20. También que el péptido EAR-20 potencia la actividad de los NMDARs conformados por subunidades con mutaciones que provocan una pérdida de función del receptor (GluN1-GluN2A V820I, GluN1-GluN2A R692G y GluN1-GluN2B P553T), en este sentido la actividad PAM de EAR-20 sobre los NMDARs mutados fue similar a la

encontrada en los di-heterómeros wt (GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B). En tanto el residuo de S773A localizado en la subunidad GluN1 parece no tener por sí solo un efecto importante como posible punto de interacción para la unión de EAR-20 en el di-heterómero GluN1-GluN2B. Todos estos resultados muestran a EAR-20 como un compuesto susceptible de ser evaluado como un potencial agente terapéutico para el tratamiento de diferentes patologías asociadas con la hipofunción del NMDAR.

## 6.2 Recomendaciones

Se recomienda hacer estudios con miras a determinar si el péptido EAR-20 es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, ya que con estos resultados se podría definir los sistemas de administración de EAR-20, para su posterior evaluación en modelos murinos de esquizofrenia o enfermedades relacionadas con la hipofunción del NMDAR.

Debido a que en este estudio no se logró determinar el sitio de unión del péptido EAR-20 en el NMDARs, se hace necesario realizar estudios de dinámica molecular que permitan identificar residuos que estén posiblemente involucrados en esta interacción, que tras una mutagénesis dirigida pueda comprobarse experimentalmente estos hallazgos *in silico*. La identificación del sitio de unión del péptido EAR-20 permitiría la localización de un nuevo sitio alostérico del NMDAR, que tendría potencial para el diseño de nuevos compuestos con mayor actividad PAM.

También sería muy importante tratar de determinar la estructura tridimensional del péptido EAR-20 mediante métodos experimentales como la RMN o criomicroscopía electrónica, ya que con esta información se podría determinar con mayor exactitud la interacción EAR-20 -NMDAR.



## A. Anexo: Secuencias de aminoácidos de las subunidades del NMDAR utilizadas

Rat GluN1 (Yamamoto's clone)

>gi|8393484|ref|NP\_058706.1| glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1 [Rattus norvegicus]

MSTMHLLTFALLFSCSFARAACDPKIVNIGAVLSTRKHEQMFREAVNQANKRHGSWKIQ  
LNATSVTHKPNAIQMALSVCEDLISSQVYAILVSHPPTPNDHFTPTVSYTAGFYRIPVLG  
LTTRMSIYSDKSIHLSFLRTVPPYSHQSSVWFEMMRVYNWNHIILLVSDDHEGRAAQKR  
LETLLERESKAEKVLQFDPGTKNVTALLMEARELEARVIILSASEDDAATVYRAAAMLN  
MTGSGYVWLVGEREISGNALRYAPDGIIGLQLINGKNESAHISDAVGVVAQAVHELLEKE  
NITDPPRGCVGNTNIWKTGPLFKRVLMSKYADGVTGRVEFNEDGDRKFANYSIMNLQN  
RKL VQVGIYNGTHVIPNDRKIIWPGGETEKPRGYQMSTRLKIVTIHQEPFVYVKPTMSDG  
TCKEEFTVNGDPVKKVICTGPNDTSPGSPRHTVPQCCYGFCIDLLIKLARTMNFTYEVLH  
VADGKFGTQERVNNSNKKEWNGMMGELLSGQADMIVAPLTINNERAQYIEFSKPFKYQ  
GLTILVKKEIPRSTLDSFMQPFQSTLWLLVGLSVHVAVMLYLLDRFSPFGRFKVNSEEE  
EEDALTLSSAMWFSWGVLLNSGIGEGAPRSFSARILGMVWAGFAMIIVASYTANLAAFLV  
LDRPEERITGINDPRLRNPSDKFIYATVKQSSVDIYFRRQVELSTMYRHMEKHNYESAEE  
AIQAVRDNKLHAFIWDSAVLEFEASQKCDLVTTGELFFRSGFGIGMRKDSPWKQNVLSI  
LKSHENGFMEDLDKTWVRYQECD SRSNAPATLTFENMAGVFMLVAGGIVAGIFLIFIEIAY  
KRHKDARRKQMQLAFAAVNVWRKNLQDRKSGRAEPDPKKKATFRAITSTLASSFKRRR  
SSKDTSTGGGRGALQ NQKDTVLPRAIEREEGQLQLCSRHRES

Underlined= C terminus



>NP\_036705.3 glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A precursor [Rattus norvegicus]

MGRLGYWTLVLPALLVWRDPAQNAAAEKGPPALNIAVLLGHSHDVTRELRNLWGPE  
QATGLPLDVNVVALLMNRTDPKSLITHVCDLMSGARIHGLVFGDDTDQEAVAQMLDFIS  
SQTFIGILGIHGGASMIMADKPTSTFFQFGASIQQQATVMLKIMQDYDWHVFSLVTTIFP  
GYRDFISFIKTTVDNSFVGWDMQNVITLDTSFEDAQTQVQLKKIHSSVILLYCSKDEAVLIL  
SEARSLGLTG YDFFWIVPSLVSGNTELPKEFP SGLISVSYDDWDYSLEARVRDGLGILT  
AASSMLEKFSYIPEAKASCYGQAEKPETPLHTLHQFMVNVTWGKDL SFTEEGYQVHP  
RLVVIVLNKDREWEKVGK WENQTL SLRHAVWPRYKSFSDCEPDDNHL SVTLEEAPFVIV  
EDIDPLTETCVRNTVPCRKFVKINNSTNEGMNVKKCKGFCIDILK KLSRTVKFTYDLYLV  
TNGKHGKKVNNVWNGMIGEVVYQRAVMAVGSLTINEERSEV VDFSVPFVETGISVMVS  
RSNGTVSPSAFLEPFSASVWVMMFVMLLIVSAIAVVFVEYFSPVGYNRNLAKGKAPHGP  
SFTIGKAIWLLWGLVFNNSVPVQNPKGTTSKIMVSVWAFFAVIFLASYTANLAAFMIQEEF  
VDQVTGLSDKKFQRPHDYSPPFRFGTVPNGSTERNIRNNYPYMHQYMTRFNQRGVED  
ALVSLKTGKLDAFIYDAAVLNKAGRDEGCKLVTIGSGYIFATTGYGIALQKGSPWKRQID  
LALLQFVG DGEMEELETLWLTGICHNEKNEVMSSQLDIDNMAGVFYMLAAAMALSLITFI  
WEHLFYWKLRF CFTGVCSRPGLLFSISRGIYSCIHG VHIIEKKKSPDFNLTGSQSNMLK  
LLRSKKNISNMSNMN SSRMDSPKRATDFIQRGSLIVDMVSDKGNLIYSDNRSFQ GKDSIF  
GDNMNELQTFVANRHKDNL SNYVFQGGHPLTLNESNPNTVEVAVSTESKGN SRPRQL  
WKKSMESLRQDSL NQNPVSQRDEKTAENRTHSLKSPRYLPEEVAHSDISETSSRATCH  
REPDNNKNHKTKDNFKRSMASKYPKDCSDVDRTYMKT KASSPRDKIYTIDGEKEPSFHL  
DPPQFVENITLPENVGFPD TYQDHENFRKGDSTLPMNRNPLH NEDGLPNNDQYKLYA  
KHFTLKDKGSPHSEGS DRYRQNSTHCRSCLSNLPTYSGHFTMRSPFKCDA CLRMGNLY  
DIDEDQMLQETGNPATREEVYQQDWSQNNALQFQKNKLRINRQH SYDNILDKPREIDLS  
RPSRSISLKDRERLLEGNLYGSLFVSPSSKLLGNKSSLPQGLEDSKR SKSLLPDHASDN  
PFLHTYGDDQRLVIGRCPSPDYKHS LPSQAVNDSYLRSSLRSTASYCSRDSRGHSDVYI  
SEHVMPYAANKNTMYSTPRVLN SCSNRRVYKKMPSIESDV

>gi|508292|gb|AAA50554.1|GluN2B subunit [Rattus norvegicus]

MKPSAECCSPKFWLVLAFLAVSGSKAR(27)SQKSPPSIGIAVILVGTSDDEVAIKDAHEKDD  
FHHLVSVPRVELVAMNETDPKSIITRICDLMSDRKIQGVVFADDDQEAIAQILDFISAQTL  
TPILGIHGGSSMIMADKDESSMFFQFGPSIEQQASVMLNIMEEYDWYIFSIVTTYFPGYQD  
FVNKIRSTIENSFVGWELEEVLLLDMSLDDGDSKIQNQLKQLQSPIILLYCTKEEATYIFEV  
ANSVGLTGYGYTWIVPSLVAGDTPVPSEFPTGLISVSYDEWDYGLPARVRDGAIIITAA  
SDMLSEHSFIPEPKSSCYNTHEKRIYQSNMLNRYLINVTFEGRNLSFSEDGYQMHPKLVII  
LLNKERKWVERVGKWKDKSLQMKYVWPRMCPETEEQEDDHLISIVTLEEAPFVIVESVD  
PLSGTCMRNTVPCQKRIISENKTDEEPGYIKKCKGFCIDILKKISKSVKFTYDLYLVNKGK  
HGK KINGTWNGMIGEVVMKRAYMAVGSLTINEERSEVDFSVPIETGISVMVSRNGT  
VSPSAFLEPFSADVWMMFVMLLIVSAVAVFVEYFSPVGYNRCLADGREPGGPSFTIG  
KAIWLLWGLVFNNSVPVQNPKGTTSKIMVSVWAFFAVIFLASYTANLAAFMIQEEYVDQV  
SGLSDKKFQRPNDPSPFRFGTVPNGSTERNIRNNYAEMHAYMGKFNQRGVDDALLSL  
KTGKLDAFIYDAAVLN YMAGRDEGCKLVTIGSGKVFASSTGYGIAIQKDSGWKRQVDLAIL  
QLFGDGEMEELEALWLTGICHNEKNEVMSSQLDIDNMAGVFYMLGAAMALSLITFICEHL  
FYWQFRHCFMGVCSGKPGMVFSISRGIYSCIHGVAIEERQSVMNSTATMNNTHSNILR  
LLRTAKNMANLSGVNGSPQSALDFIRRESSVYDISEHRRSFTHSDCKSYNNPPCEENLF  
SDYISEVERTFGNLQLKDSNVYQDHYHHHHRPHSIGSTSSIDGLYDCDNPPFTTQPRIS  
KKPLDIGLPSSKHSQLSDLYGKFSFKSDRYSGHDDLIRSDVSDISTHTVTYGNIEGNAAKR  
RKQQYKDSLKKRPASAKSRREFDEIELAYRRRPPRSPDHKRYFRDKEGLRDFYLDQFRT  
KENS PHWEHVLDLTDIYKERSDDFKRDSVSGGGPCTNRSHLKHGTGEKHG VVGVPAP  
WEKNLTNVDWEDRSGGNFCRSCPSKLNYSSTVAGQNSGRQACIRCEACKKAGNLYDI  
SKDNSLQELDQPAAPVAVTSNASSTKYPQSPTNSKAQKKNRNKLRQHSYDTFVDLQK  
EEAALAPRSVSLKDKGRFMDGSPYAHMFEMPAGESSEFANKSSVPTAGHHHNNPGSGY  
MLSKSLYPDRVTQNPFIPTFGDDQCLLHGSKSYFFRQPTVAGASKTRPDFRALVTNKPV  
VSALHGAVPGRFQKDCIGNQSNPCVPNNKNPRAFNGSSNGHVYEKLSSIESDV

>XP\_038941112.1 glutamate receptor ionotropic, NMDA 2C isoform X2 [Rattus norvegicus]

MGGALGPALLLTSLLGAWARLGAGQGEQAVTVAVVFGSSGPLQTQARTRLTSQNFLDL  
PLEIQPLTVGVNNTNPSSILTQICGLLGAARVHGIVFEDNVDTEAVAQLLDFVSSQTHVPIL  
SISGGSAAVLTPEPGSAFLQLGVSLEQQQLQVLFKVL EEYDWSAFVITSLHPGHALFLE  
GVRVADASYLSWRLLDVL TLELGGPRARTQRLLRQVDAPVLVAYCSREEAEVLF AE  
AAQAGLVGPGHVWLVPNLALGSTDAPPAAFPVGLISVVTESWRLSLRQKVRDGVAILAL  
GAHSYRRQYGTLPAPAGDCRSHPGPVSPAREAFYRHLLNVTWEGRDFSFSPPGGYLVR  
PTMVVIALNRHRLWEMVGRWDHGVLYMKYPVWPRYSTSLQPVVDSRHLLTVATLEERPF  
VIVESPDPGTGGCVPNTVPCRRQSNHTFSSGDLTPYTKLCKGFCIDILKKLAKVVKFSY  
DLYLVTNGKHGKRVRGVWNGMIGEVYYKRADMAIGSLTINEERSEIIDFSVPFVETGISV  
MVSRSNGTVSPSAFLEPYSPAVWMMFMCLTVVAITVFMFEYFSPVSYNQNLTKGKK  
PGGPSFTIGKSVWLLWALVFNNVPIENPRGTTSKIMVLVWAFFAVIFLASYTANLAAFMI  
QEQYIDTVSGLSDKKFQRPQDQYPPFRFGTVPNGSTERNIRSNYRDMHMHMVKFNQRS  
VEDALTSKMGKLDAFIYDAAVLN YMAGKDEGCKLVTIGSGKVFATTGYGIAMQKDSHW  
KRAIDLALLQLLDGETQKLETVWLSGICQNEKNEVMSSKLDIDNMAGVFYMLLVAMGLL  
LVFAWEHLVYWKLRHSVPNSSQLDFLLAFSRGIYSCFNGVQSLPSPARPPSPDLTADSA  
QANVLKMLQAARDMVNTADVSSSLDRATR TIENWGNRRVPAPTASGPRSSTPGPPG  
QPSPSGWGPPGGGRTPLARRAPQPPARPATCGPPLPDVSRPSCRHASDARWPVRVG  
HQGPHVSASERRALPERSLLPAHCHYSSFPRASGRPYLPLFPEPPEPDDLPLLGPEQ  
LARREAMLRAAWARGPRPRHASLPSSVAEAFTRSNPLPARCTGHACACPCPQSRPSC  
RH LAQAQSLRLPSYPEACVEGVPAGVATWQPRQHVCLHAHTRL PFCWGTVCRHPPPC  
TSHSPWLIGTWEPPAHRVRTLGLGTGYRDSGVLEEV SREACGTQGFPRSCTWRRVSSL  
ESEV

>AAC37646.1 NMDA receptor subunit NR2D [Rattus norvegicus]

MRGAGGPRGPRGPAKMLLLLALACASPFPEEVPGPGAVGGGTGGARPLNVALVFSGP  
AYAAEAARLVPAAVAARSPGLDVRPVALVLNGSDPPSLVLQLCDLLSGLRVHGVFED  
DSRAPAVAPILDFLSAQTSLPIVAVHGGAAVLTPKEKGSTFLQLGSSTEQQLQVIFEVLE  
EYDWTFSFVAVTTRAPGHRAFLSYIEVLTDGSLVGWEHRGALTDPGAGEAVLGAQLRSV  
SAQIRLLFCAREEAEPVFRAAEEAGLTGPGYVWFVMPQLAGGGGSGVPGEPLLLPGG  
SPLPAGLFAVASAGWRDDLARRVAAGVAVVARGAQALLRDYGFLELGHDCRTQNRTH  
RGESLHRYFMNITWDNRDYSFNEDGFLVNPSLVVISLTRDRTWEVVGSWEQQTLRLKY  
PLWSRYGRFLQPVDDTQHLTVATLEERPFVIVEPADPISGTCIRDSVPCRSQLNRTHSPP  
PDAPRPEKRCCKGFCIDILKRLAHTIGFSYDLYLVTNGKHGKKIDGVWNGMIGEVFYQRA  
DMAIGSLTINEERSEIVDFSVPFVETGISVMVARSNGTVSPSAFLEPYSPAVWMMFVMC  
LTVAVTVFIFEYLSPVGYNRSLATGKRPGGSTFTIGKSIWLLWALVFNNSVVENPRGT  
TSKIMVLVWAFFAVIFLASYTANLAAFMIQEEYVDTVSGLSDRKFQRPQEQYPPKFGTV  
PNGSTEKNIRSNYPDMHSYMVRYNQPRVEEALTQLKAGKLDAFIYDAAVLNYMARKDEG  
CKLVTIGSGKVFATTGYGIALHKGSRWKRPIDLALLQFLGDDEIEMLERLWLSGICHNDKI  
EVMSSKLDIDNMAGVFYMLLVAMGLSLLVFAWEHLVYWRLRHCLGPTHRMDFLLAFSR  
GMYSCCSAEAAAPPAKPPPPQPLPSPAYPAARPPPGPAPFVPRERAAADRWRRAKG  
TGPPGGAAIADGFHRYYGPIEPQGLGLGEARAAPRGAAGRPLSPPTTQPPQKPPPSYFA  
IVREQEPTTEPPAGAFPGFPSPAPPAAAAAAVGPPLCRLAFEDSPAPSRWPRSDPES  
QPLLGGGAGGPSAGAPTAPPPRAAPPCAYLDLEPSPSSESESLGGASLGGLEP  
WWFADFPYPYAERLGPPPGRYWSVDKLGGRAGSWDYLPFRGGPAWHCRHCASLEL  
LPPPRHLSCSHDGLDGGWWAPPPPPWAAGPPPRRRARCGCPRPHPHRPRASHRAPA  
AAPHHHRHRAAGGWDFPPPAPTSRSLEDLSSCPRAAPTRRLTGPSRHARRCPHAAH  
WGPPLPTASHRRHRGGDLGTRRGS AHFSSLESEV



## B. Anexo: Primers diseñados

### Aminoácidos Mutagénesis Interacción EAR20- NMDARs

4 aas candidatos de subunidades NMDARs:

**S773- GluN1** (2 interacciones con aas de EAR20)

W498 - GluN1

S189 – GluN1

D524 – GluN2B

**GluN1 - W498G (Cambio de un triptófano por una glicina)**

Forward: 5'-acagcaacaaaaaggagg<sup>g</sup>ggaacggaatgatgggc-3'

Reverse: 5'-gcccatcattccgttcc<sup>c</sup>ctccttttgtgctgt-3'

#### Primer sequences:

Primer Name	Primer Sequence (5' to 3')
t1492g_	5'-gcccatcattccgttccctccttttgtgctgt-3' 5'-acagcaacaaaaaggaggggaacggaatgatgggc-3'

#### Oligonucleotide information:

Primer Name	Length (nt.)	Tm	Duplex Energy at 68 °C	Energy Cost of Mismatches
t1492g_	35	79.27°C	-41.03 kcal/mole	4.67%
t1492g_	35	79.27°C	-50.28 kcal/mole	1.95%

#### Primer-template duplexes:

Primer Name	Primer-Template Duplex
t1492g_	acaacagcaacaaaaaggagtggaaacggaatgatgggcgag     3'-tggtcggtgtttttcctccccttgcocttactaccgc-5' 5'-acagcaacaaaaaggaggggaacggaatgatgggc-3'     tggtcggtgtttttcctcaccttgcocttactaccgcctc

**GluN1 - S773G (Cambio de una serina por una glicina)**

Forward: 5'-ccctggaagcagaacgtt<sup>g</sup>gctgtccatactcaag-3'

Reverse: 5'-ctgtagatggacagg<sup>c</sup>caacgttctgctccagggg-3'

**Primer sequences:**

Primer Name	Primer Sequence (5' to 3')
t2317g_c2318g_	5'-ctgagatggacaggccaacgtctgctccaggg-3' 5'-ccctggaagcagaacgttgccctcactcaag-3'

**Oligonucleotide information:**

Primer Name	Length (nt.)	Tm	Duplex Energy at 68 °C	Energy Cost of Mismatches
t2317g_c2318g_	37	80.01°C	-50.26 kcal/mole	5.58%
t2317g_c2318g_	37	80.01°C	-51.81 kcal/mole	1.84%

**Primer-template duplexes:**

Primer Name	Primer-Template Duplex
t2317g_c2318g_	<pre> cagccctggaagcagaacgtttccctgtccataactcaagtcc       3'-ggggaccttcgctcttgcaaacggacaggtatgagttc-5' 5'-ccctggaagcagaacgttgccctgtccataactcaag-3'       gtcggggaccttcgctcttgcaaaagggacaggtatgagttcagg </pre>

**GluN1 - S189G (Cambio de una serina por una glicina)**

Forward: 5'-ctggaggaacgggagggcaaggcagagaaggt-3'

Reverse: 5'-accttctgccttgcctcccgctcctcag-3'

**Primer sequences:**

Primer Name	Primer Sequence (5' to 3')
t565g_c566g_	5'-accttctgccttgcctcccgctcctcag-3' 5'-ctggaggaacgggagggcaaggcagagaaggt-3'

**Oligonucleotide information:**

Primer Name	Length (nt.)	Tm	Duplex Energy at 68 °C	Energy Cost of Mismatches
t565g_c566g_	32	78.50°C	-44.70 kcal/mole	9.26%
t565g_c566g_	32	78.50°C	-50.70 kcal/mole	4.88%

**Primer-template duplexes:**

Primer Name	Primer-Template Duplex
t565g_c566g_	<pre> ttgctggaggaaacgggaggtccaaggcagagaaggtgct       3'-gacctccttgccctcccgctcctcctcctcca-5' 5'-ctggaggaacgggagggcaaggcagagaaggt-3'       aacgacctccttgccctcagggtccgctcctcctccaagca </pre>

**GluN2B – D524G (Cambio de un Aspártico por una Glicina)**

Forward: 5'-cggtcagaggtggtgcttctgtacccttc-3'

Reverse: 5'-gaagggtacagagaagccaaccacctgaccg-3'

**Primer sequences:**

Primer Name	Primer Sequence (5' to 3')
a1571g_	5'-gaagggtacagagaagccaaccacctgaccg-3' 5'-cggtcagaggtggtgcttctgtacccttc-3'

**Oligonucleotide information:**

Primer Name	Length (nt.)	Tm	Duplex Energy at 68 °C	Energy Cost of Mismatches
a1571g_	33	80.38°C	-47.39 kcal/mole	3.21%
a1571g_	33	80.38°C	-43.60 kcal/mole	4.26%

**Primer-template duplexes:**

Primer Name	Primer-Template Duplex
a1571g_	<pre> gaacgggtcagaggtggtgacttctctgtacccttcata       3'-gccagtcctccaccaaccgaagagacatgggaag-5' 5'-cggtcagaggtggtggttctctgtacccttc-3'       cttgccagtcctccaccaactgaagagacatgggaagtat </pre>

## 7. Bibliografía

*BIOVIA Discovery Studio Visualizer - Dassault Systèmes* (no date). Available at: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download> (Accessed: 16 February 2021).

Adrienne C. Lahti, M.D., Martin A. Weiler, M.D., Tamara Michaelidis B.A., Arti Parwani, M.D., and Carol A. Tamminga, M. . (2001) 'Effects of Ketamine in Normal and Schizophrenic Volunteers', *Neuropsychopharmacology*, 25, pp. 455–467. doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.03.003.

Alberdi, E. *et al.* (2010) 'Amyloid  $\beta$  oligomers induce Ca<sup>2+</sup> dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors', *Cell Calcium*, 47(3), pp. 264–272. doi: 10.1016/j.ceca.2009.12.010.

Angeles, L. and Horn, J. D. Van (2014) 'REVIEWING THE KETAMINE MODEL FOR SCHIZOPHRENIA', 28(4), pp. 287–302. doi: 10.1177/0269881113512909.REVIEWING.

Antonio Sanz-Clemente, Roger A. Nicoll and Katherine W. Roche (2013) 'Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences', *Neuroscientist*, 19(1), pp. 62–75. doi: 10.1177/1073858411435129.Diversity.

Areles Molleman (2003) *Patch clamping*.

B., Kasper Hansen, Lonnie P. Wollmuth, Derek Bowie, Hiro Furukawa, Frank S. Menniti, Alexander I. Sobolevsky, Geoffrey T. Swanson, Sharon A. Swanger, Ingo H. Greger, Terunaga Nakagawa, Chris J. McBain, Vasanthi Jayaraman, Chian-Ming Low, Mark L. Dell'Acqu, S. F. T. (2021) *Receptor Ion Channels S*.

Balsara, R. *et al.* (2015) 'Conantokin-G attenuates detrimental effects of NMDAR hyperactivity in an ischemic rat model of stroke', *PLoS ONE*, 10(3), pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0122840.

Banerjee, A. *et al.* (2016) 'Roles of Presynaptic NMDA Receptors in Neurotransmission and Plasticity', *Trends in Neurosciences*. Elsevier Ltd, 39(1), pp. 26–39. doi: 10.1016/j.tins.2015.11.001.

Behrendt, R., White, P. and Offer, J. (2016) 'Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis', *Journal of Peptide Science*, 22(1), pp. 4–27. doi: 10.1002/psc.2836.

Bellows-Peterson, M. L. *et al.* (2012) 'De novo peptide design with C3a receptor agonist and antagonist activities: Theoretical predictions and experimental validation', *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(9), pp. 4159–4168. doi: 10.1021/jm201609k.



- Bledsoe, D. *et al.* (2019) 'Ligand binding domain interface: A tipping point for pharmacological agents binding with GluN1/2A subunit containing NMDA receptors', *European Journal of Pharmacology*. Elsevier B.V., 844(December 2018), pp. 216–224. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.12.023.
- Bonaccorso, C. *et al.* (2011) 'Glutamate Binding-Site Ligands of NMDA Receptors', *Current Medicinal Chemistry*, 18(36), pp. 5483–5506. doi: 10.2174/092986711798347225.
- Bouvier, G. *et al.* (2015) 'Presynaptic NMDA receptors: Roles and rules', *Neuroscience*. IBRO, 311, pp. 322–340. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.10.033.
- Burnell, E. S. *et al.* (2019) 'Positive and Negative Allosteric Modulators of N-Methyl- d -aspartate (NMDA) Receptors: Structure-Activity Relationships and Mechanisms of Action', *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(1), pp. 3–23. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01640.
- Carpino, L. A. and Han, G. Y. (1970) 'The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Function, a New Base-Sensitive Amino-Protecting Group', *Journal of the American Chemical Society*, 92(19), pp. 5748–5749. doi: 10.1021/ja00722a043.
- Chaudhary, K. K. and Mishra, N. (2016) 'A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery', *JSM Chem*, 4(3), p. 1029.
- Chen, Y. S. *et al.* (2019) 'Desensitization of NMDA channels requires ligand binding to both GluN1 and GluN2 subunits to constrict the pore beside the activation gate', *Journal of Neurochemistry*, (July), pp. 1–18. doi: 10.1111/jnc.14939.
- Chopra, D. A., Monaghan, D. T. and Dravid, S. M. (2015) 'Bidirectional effect of pregnenolone sulfate on GluN1/GluN2A N-Methyl-D-aspartate receptor gating depending on extracellular calcium and intracellular milieu', *Molecular Pharmacology*, 88(4), pp. 650–659. doi: 10.1124/mol.115.100396.
- Chopra, Di. A. *et al.* (2017) 'A single-channel mechanism for pharmacological potentiation of GluN1/GluN2A NMDA receptors', *Scientific Reports*. Springer US, 7(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-017-07292-8.
- Collingridge, G. L. *et al.* (2009) 'A nomenclature for ligand-gated ion channels', *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd, 56(1), pp. 2–5. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.063.
- Collingridge, G. L. and Abraham, W. C. (2022) 'Glutamate receptors and synaptic plasticity: The impact of Evans and Watkins', *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd, 206, p. 108922. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108922.
- Conforti, L. (2012) *Patch-clamp techniques*. Fourth Edi, *Cell Physiology Source Book*. Fourth Edi. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-387738-3.00020-2.
- Coombs, I. D. and Soto, D. (2016) *Receptor and Ion Channel Detection in the Brain*. doi: 10.1007/978-1-4939-3064-7.
- Coyle, J. T. (2012) 'NMDA receptor and schizophrenia: A brief history', *Schizophrenia Bulletin*, 38(5), pp. 920–926. doi: 10.1093/schbul/sbs076.

- D'Hondt, M. *et al.* (2014) 'Related impurities in peptide medicines', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101, pp. 2–30. doi: 10.1016/j.jpba.2014.06.012.
- Decherchi, S. and Cavalli, A. (2020) 'Thermodynamics and Kinetics of Drug-Target Binding by Molecular Simulation', *Chemical Reviews*, 120(23), pp. 12788–12833. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00534.
- E. Kaiser *et al.* 1969 (1969) 'Color test for detection of free Terminal Amino Groups in the solid-phase Synthesis of peptides', pp. 595–598.
- Elmasri, M. *et al.* (2022) 'Common synaptic phenotypes arising from diverse mutations in the human NMDA receptor subunit GluN2A', *Communications Biology*. Springer US, 5(1), pp. 1–17. doi: 10.1038/s42003-022-03115-3.
- Endele, S. *et al.* (2010) 'Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 42(11), pp. 1021–1026. doi: 10.1038/ng.677.
- Eric Atherton, Christopher J. Logan, and Robert C. Sheppard, M. R. C. (no date) 'Procedures for Solid-phase Synthesis using alfa-N-Fluorenylmethoxycarbonylamino-acids on Polyamide Supports. Synthesis of Substance P and of Acyl Carrier Protein 65-74 Decapeptide', *J.C.S. Perkin I*, (538).
- Eriksen *et al.* 2016 (2016) 'Protons Regulate Vesicular Glutamate Transporters through an Allosteric Mechanism', *Neuron*, pp. 768–780. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- Erreger, K. *et al.* (2007) 'Subunit-Specific Agonist Activity at NR2A-, NR2B-, NR2C-, and NR2D-Containing N-Methyl-D-aspartate Glutamate Receptors', 72(4), pp. 907–920. doi: 10.1124/mol.107.037333.trigger.
- Esmenjaud, J. *et al.* (2019a) 'An inter-dimer allosteric switch controls NMDA receptor activity', *The EMBO Journal*, 38(2). doi: 10.15252/embj.201899894.
- Esmenjaud, J. *et al.* (2019b) 'An inter-dimer allosteric switch controls NMDA receptor activity', *The EMBO Journal*, 38(2), p. e99894. doi: 10.15252/embj.201899894.
- Fedele, L. *et al.* (2018) 'Disease-associated missense mutations in GluN2B subunit alter NMDA receptor ligand binding and ion channel properties', *Nature Communications*, 9(1). doi: 10.1038/s41467-018-02927-4.
- Ferreira, L. G. *et al.* (2015) *Molecular docking and structure-based drug design strategies*, *Molecules*. doi: 10.3390/molecules200713384.
- Fosgerau, K. and Hoffmann, T. (2015) 'Peptide therapeutics: current status and future directions.', *Drug discovery today*. Elsevier Ltd, 20(1), pp. 122–8. doi: 10.1016/j.drudis.2014.10.003.
- Frankiewicz, T., Pilc, A. and Parsons, C. G. (2000) 'Differential effects of NMDA-receptor antagonists on long-term potentiation and hypoxic/hypoglycaemic excitotoxicity in hippocampal slices', *Neuropharmacology*, 39(4), pp. 631–642. doi: 10.1016/S0028-3908(99)00168-9.

Furukawa, H. *et al.* (2005) 'Subunit arrangement and function in NMDA receptors', *Nature*, 438(7065), pp. 185–192. doi: 10.1038/nature04089.

Furukawa, H. (2012) 'Structure and function of glutamate receptor amino terminal domains', *Journal of Physiology*, 590(1), pp. 63–72. doi: 10.1113/jphysiol.2011.213850.

Geldenhuis, W. J. *et al.* (2006) 'Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery', *Drug Discovery Today*, 11(3–4), pp. 127–132. doi: 10.1016/S1359-6446(05)03692-5.

Geoffroy, C., Paoletti, P. and Mony, L. (2021) 'Positive allosteric modulation of NMDA receptors: mechanisms, physiological impact and therapeutic potential', *Journal of Physiology*, 0, pp. 1–27. doi: 10.1113/JP280875.

Gibb, A. J. (2022) 'Allosteric antagonist action at triheteromeric NMDA receptors', *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd, 202(July 2021), p. 108861. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108861.

Gregory, K. J., Noetzel, M. J. and Niswender, C. M. (2013) *Pharmacology of Metabotropic Glutamate Receptor Allosteric Modulators*. 1st edn, *Oligomerization and Allosteric Modulation in G-Protein Coupled Receptors*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/b978-0-12-394587-7.00002-6.

Hackos, D. H. *et al.* (2016) 'Positive Allosteric Modulators of GluN2A-Containing NMDARs with Distinct Modes of Action and Impacts on Circuit Function', *Neuron*, 89(5), pp. 983–999. doi: 10.1016/j.neuron.2016.01.016.

Hammond, C. (2015) 'The ionotropic glutamate receptors', *Cellular and Molecular Neurophysiology: Fourth Edition*, pp. 221–244. doi: 10.1016/B978-0-12-397032-9.00010-8.

Hansen, K. B. *et al.* (2014) 'Distinct functional and pharmacological properties of triheteromeric GluN1/GluN2A/GluN2B NMDA receptors', *Neuron*. Elsevier Inc., 81(5), pp. 1084–1096. doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.035.

Hardingham, G. E. and Bading, H. (2010) 'Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: Implications for neurodegenerative disorders', *Nature Reviews Neuroscience*, pp. 682–696. doi: 10.1038/nrn2911.

He, Y. *et al.* (2019) 'Recent progress in allosteric modulators for GluN2A subunit and development of GluN2A-selective nuclear imaging probes', *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 62(8), pp. 552–560. doi: 10.1002/jlcr.3744.

Hertz, L. (2013) 'The glutamate-glutamine (GABA) cycle: Importance of late postnatal development and potential reciprocal interactions between biosynthesis and degradation', *Frontiers in Endocrinology*, 4(MAY), pp. 1–16. doi: 10.3389/fendo.2013.00059.

Hollmann, M. *et al.* (1989) 'Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family', *Nature*, 342(6250), pp. 643–648. doi: 10.1038/342643a0.

Hollmann, M. (1994) 'Cloned Glutamate Receptors', *Annual Review of Neuroscience*,

17(1), pp. 31–108. doi: 10.1146/annurev.neuro.17.1.31.

Horak, M. *et al.* (2014) 'ER to synapse trafficking of NMDA receptors', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(NOV), pp. 1–18. doi: 10.3389/fncel.2014.00394.

Huang, A. C. W., Bo-Han He, A. and Chen, C. C. (2017) 'An examination of the roles of glutamate and sex in latent inhibition: Relevance to the glutamate hypothesis of schizophrenia?', *Psychiatry Research*. Elsevier Ireland Ltd, 256(June), pp. 46–52. doi: 10.1016/j.psychres.2017.06.033.

Huang, H. and Rabenstein, D. L. (1999) 'A cleavage cocktail for methionine-containing peptides', *Journal of Peptide Research*, 53(5), pp. 548–553. doi: 10.1034/j.1399-3011.1999.00059.x.

Hubbard, J. A. and Binder, D. K. (2016) 'Glutamate Metabolism', *Astrocytes and Epilepsy*, pp. 197–224. doi: 10.1016/b978-0-12-802401-0.00009-0.

*I-TASSER server for protein structure and function prediction* (no date). Available at: <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> (Accessed: 16 February 2021).

Inanobe, A., Furukawa, H. and Gouaux, E. (2005) 'Mechanism of partial agonist action at the NR1 subunit of NMDA receptors', *Neuron*, 47(1), pp. 71–84. doi: 10.1016/j.neuron.2005.05.022.

Iwata, Y. *et al.* (2015) 'Effects of glutamate positive modulators on cognitive deficits in schizophrenia: A systematic review and meta-Analysis of double-blind randomized controlled trials', *Molecular Psychiatry*. Nature Publishing Group, 20(10), pp. 1151–1160. doi: 10.1038/mp.2015.68.

Jaradat, D. M. M. (2018) 'Thirteen decades of peptide synthesis: key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation', *Amino Acids*. Springer Vienna, 50(1), pp. 39–68. doi: 10.1007/s00726-017-2516-0.

Kane, L. T. and Costa, B. M. (2015) 'Identification of novel allosteric modulator binding sites in NMDA receptors: A molecular modeling study', *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. Elsevier Inc., 61, pp. 204–213. doi: 10.1016/j.jmkgm.2015.06.007.

Karakas, E. and Furukawa, H. (2014) 'Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel', *Science*, 344(6187), pp. 992–997. doi: 10.1126/science.1251915.

Karakas, E., Simorowski, N. and Furukawa, H. (2009) 'Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit', *EMBO Journal*. Nature Publishing Group, 28(24), pp. 3910–3920. doi: 10.1038/emboj.2009.338.

Karakas, E., Simorowski, N. and Furukawa, H. (2011) 'Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors', *Nature*. Nature Publishing Group, 475(7355), pp. 249–253. doi: 10.1038/nature10180.

kazu Nakazawa and Kiran Sapkota (2020) 'The origin of NMDA receptor hypofunction in schizophrenia', *pharmacol Ther*, 205(1), pp. 1–33. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.107426.The.

- Kevin Erreger, Matthew T. Geballe, Shashank M. Dravid, James P. Snyder, David J. A. Wyllie, and Traynelis, S. F. (2005) 'Mechanism of Partial Agonism at NMDA Receptors for a Conformationally Restricted Glutamate Analog', *Journal of Neuroscience*, 25(34), pp. 7858–7866. doi: 10.1523/jneurosci.1613-05.2005.
- Kew, J. N. C. *et al.* (1998) 'Developmental changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons', *Journal of Neuroscience*, 18(6), pp. 1935–1943. doi: 10.1523/jneurosci.18-06-01935.1998.
- Khatri, A. *et al.* (2014) 'Structural determinants and mechanism of action of a GluN2C-selective NMDA receptor positive allosteric modulator', *Molecular Pharmacology*, 86(5), pp. 548–560. doi: 10.1124/mol.114.094516.
- Kufareva, I. and Abagyan, R. (2012) 'Methods of protein structure comparison', *Methods in Molecular Biology*, 857, pp. 231–257. doi: 10.1007/978-1-61779-588-6\_10.
- Kussius, C. L. and Popescu, G. K. (2010) 'NMDA receptors with locked glutamate-binding clefts open with high efficacy', *Journal of Neuroscience*, 30(37), pp. 12474–12479. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3337-10.2010.
- Kysilov, B. *et al.* (2022) 'Pregnane-based steroids are novel positive NMDA receptor modulators that may compensate for the effect of loss-of-function disease-associated GRIN mutations', *British Journal of Pharmacology*, (February), pp. 3970–3990. doi: 10.1111/bph.15841.
- Ladislav, M. *et al.* (2018) 'The LILI Motif of M3-S2 Linkers Is a Component of the NMDA Receptor Channel Gate', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(April), pp. 1–16. doi: 10.3389/fnmol.2018.00113.
- Lamiable, A. *et al.* (2016) 'PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex', *Nucleic acids research*, 44(W1), pp. W449–W454. doi: 10.1093/nar/gkw329.
- Lauer, J. L., Fields, C. G. and Fields, G. B. (1995) 'Sequence dependence of aspartimide formation during 9-fluorenylmethoxycarbonyl solid-phase peptide synthesis', *Letters in Peptide Science*, 1(4), pp. 197–205. doi: 10.1007/BF00117955.
- Lazim, R., Suh, D. and Choi, S. (2020) 'Advances in molecular dynamics simulations and enhanced sampling methods for the study of protein systems', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), pp. 1–20. doi: 10.3390/ijms21176339.
- Lee, C. H. *et al.* (2014) 'NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture', *Nature*. Nature Publishing Group, 511(7508), pp. 191–197. doi: 10.1038/nature13548.
- Lerma, J. and Marques, J. M. (2013) 'Kainate receptors in health and disease', *Neuron*. Elsevier Inc., 80(2), pp. 292–311. doi: 10.1016/j.neuron.2013.09.045.
- Lichnerova, K. *et al.* (2015) 'Two N-glycosylation sites in the GluN1 subunit are essential



for releasing N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors from the endoplasmic reticulum', *Journal of Biological Chemistry*, 290(30), pp. 18379–18390. doi: 10.1074/jbc.M115.656546.

Lodge, D. *et al.* (1988) 'A comparison between the in vivo and in vitro activity of five potent and competitive NMDA antagonists', *British Journal of Pharmacology*, 95(3), pp. 957–965. doi: 10.1111/j.1476-5381.1988.tb11726.x.

Lü, W. *et al.* (2017) 'Cryo-EM structures of the trimeric NMDA receptor and its allosteric modulation', *Science*, 355(6331). doi: 10.1126/science.aal3729.

Lussier, M. P., Sanz-Clemente, A. and Roche, K. W. (2015) 'Dynamic regulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by posttranslational modifications', *Journal of Biological Chemistry*, 290(48), pp. 28596–28603. doi: 10.1074/jbc.R115.652750.

Macalino, S. J. Y. *et al.* (2015) 'Role of computer-aided drug design in modern drug discovery', *Archives of Pharmacol Research*. Pharmaceutical Society of Korea, 38(9), pp. 1686–1701. doi: 10.1007/s12272-015-0640-5.

Madry, C., Mesic, I., Bartholomäus, I., *et al.* (2007) 'Principal role of NR3 subunits in NR1/NR3 excitatory glycine receptor function', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(1), pp. 102–108. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.153.

Madry, C., Mesic, I., Betz, H., *et al.* (2007) 'The N-terminal domains of both NR1 and NR2 subunits determine allosteric Zn<sup>2+</sup> inhibition and glycine affinity of N-methyl-D-aspartate receptors', *Molecular Pharmacology*, 72(6), pp. 1535–1544. doi: 10.1124/mol.107.040071.

Maolanon, A. R. *et al.* (2017) 'Subtype-Specific Agonists for NMDA Receptor Glycine Binding Sites', *ACS Chemical Neuroscience*, 8(8), pp. 1681–1687. doi: 10.1021/acscchemneuro.7b00117.

Marchetti, C., Baranowska-Bosiacka, I. and Gavazzo, P. (2014) 'Multiple effects of copper on NMDA receptor currents', *Brain Research*. Elsevier, 1542, pp. 20–31. doi: 10.1016/j.brainres.2013.10.029.

Maus, A. and Peters, G. J. (2017) 'Glutamate and  $\alpha$ -ketoglutarate: key players in glioma metabolism', *Amino Acids*. Springer Vienna, 49(1), pp. 21–32. doi: 10.1007/s00726-016-2342-9.

Mayer, M. L. (2006) 'Glutamate receptors at atomic resolution', *Nature*, 440(7083), pp. 456–462. doi: 10.1038/nature04709.

Merrifield, R. B. (1963) 'Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide', *Journal of the American Chemical Society*, 85(14), pp. 2149–2154. doi: 10.1021/ja00897a025.

Mesic, I. *et al.* (2016) 'The N-terminal domain of the GluN3A subunit determines the efficacy of glycine-activated NMDA receptors', *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd, 105, pp. 133–141. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.01.014.

Min, M. Y., Melyan, Z. and Kullmann, D. M. (1999) 'Synaptically released glutamate reduces

$\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)ergic inhibition in the hippocampus via kainate receptors', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(17), pp. 9932–9937. doi: 10.1073/pnas.96.17.9932.

MODELLER | *Bioinformatics Toolkit* (no date). Available at: <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/modeller> (Accessed: 16 February 2021).

Mony, L. *et al.* (2009) 'Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: Molecular mechanisms and therapeutic potential', *British Journal of Pharmacology*, 157(8), pp. 1301–1317. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00304.x.

Mori, H. and Mishina, M. (1995) 'Neurotransmitter receptors VIII. Structure and function of the NMDA receptor channel', *Neuropharmacology*, 34(10), pp. 1219–1237.

Neher, E., Sakmann, B. and Steinbach, J. H. (1978) 'The extracellular patch clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes', *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 375(2), pp. 219–228. doi: 10.1007/BF00584247.

Neumann, K. *et al.* (2020) 'Prevention of aspartimide formation during peptide synthesis using cyanosulfurylides as carboxylic acid-protecting groups', *Nature Communications*. Springer US, 11(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41467-020-14755-6.

Norris, K. *et al.* (1971) 'Stability of Methionyl Residues Towards Oxidation During Solid Phase Peptide Synthesis.', *Acta Chemica Scandinavica*, pp. 945–954. doi: 10.3891/acta.chem.scand.25-0945.

Novabiochem (2012) 'Fmoc resin cleavage protocols', *Millipore is a division of Fmoc resin cleavage protocols*, pp. 2–5.

Ortega, A. and Schousboe Editors, A. (no date) *Advances in Neurobiology 16 Glial Amino Acid Transporters*.

Paoletti, P. *et al.* (2000) 'Molecular organization of a zinc binding N-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit', *Neuron*, 28(3), pp. 911–925. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00163-X.

Paoletti, P., Bellone, C. and Zhou, Q. (2013) 'NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 14(6), pp. 383–400. doi: 10.1038/nrn3504.

*peptide property molecular weight calculator-GenScript* (no date). Available at: <https://www.genscript.com/tools/peptide-molecular-weight-calculator> (Accessed: 20 May 2020).

Perszyk, R. E. *et al.* (2020) 'Biased modulators of NMDA receptors control channel opening and ion selectivity', *Nature Chemical Biology*. Springer US, 16(2), pp. 188–196. doi: 10.1038/s41589-019-0449-5.

Popoli, M. *et al.* (2012) 'The stressed synapse: The impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 13(1),

pp. 22–37. doi: 10.1038/nrn3138.

PyMOL | [pymol.org](https://pymol.org/2/) (no date). Available at: <https://pymol.org/2/> (Accessed: 16 February 2021).

Qiu, S. *et al.* (2009) 'An endoplasmic reticulum retention signal located in the extracellular amino-terminal domain of the NR2A subunit of N-methyl-D-aspartate receptors', *Journal of Biological Chemistry*, 284(30), pp. 20285–20298. doi: 10.1074/jbc.M109.004960.

QuickChange Primer Design (no date). Available at: <https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp> (Accessed: 4 September 2022).

Rachline, J. (2005) 'The Micromolar Zinc-Binding Domain on the NMDA Receptor Subunit NR2B', *Journal of Neuroscience*, 25(2), pp. 308–317. doi: 10.1523/jneurosci.3967-04.2005.

Rauner, C. and Köhr, G. (2011) 'Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors constitute the major N-methyl-D-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses', *Journal of Biological Chemistry*, 286(9), pp. 7558–7566. doi: 10.1074/jbc.M110.182600.

RCSB PDB: Homepage (no date). Available at: <https://www.rcsb.org/> (Accessed: 16 February 2021).

Reiner, A. and Levitz, J. (2018) 'Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert', *Neuron*. Elsevier Inc., 98(6), pp. 1080–1098. doi: 10.1016/j.neuron.2018.05.018.

Reyes-Guzman, E. A. *et al.* (2017) 'Antagonistic action on NMDA/GluN2B mediated currents of two peptides that were conantokin-G structure-based designed', *BMC Neuroscience*. BioMed Central, 18(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s12868-017-0361-4.

Rogawski, M. A. (2015) 'AMPA Receptors as a Molecular Target in Epilepsy Therapy Michael', (197), pp. 9–18. doi: 10.1111/ane.12099.AMPA.

Romero-Hernandez, A. *et al.* (2016) 'Molecular Basis for Subtype Specificity and High-Affinity Zinc Inhibition in the GluN1-GluN2A NMDA Receptor Amino-Terminal Domain', *Neuron*. Elsevier Inc., 92(6), pp. 1324–1336. doi: 10.1016/j.neuron.2016.11.006.

RUCZYNSKI, J, LEWANDOWSKA, B. MUCHA, P and REKOWSKI, P. (2007) 'Problem of aspartimide formation in Fmoc-based solid-phase peptide synthesis using Dmab group to protect side chain of aspartic acid', *Journal of peptide science*, pp. 335–341. doi: 10.1002/psc.

Salussolia, C. L. *et al.* (2011) 'Arrangement of subunits in functional NMDA receptors', *Journal of Neuroscience*, 31(31), pp. 11295–11304. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5612-10.2011.

Samson, D. *et al.* (2019) 'The aspartimide problem persists: Fluorenylmethyloxycarbonyl-solid-phase peptide synthesis (Fmoc-SPPS) chain termination due to formation of N-terminal piperazine-2,5-diones', *Journal of Peptide Science*, 25(7), pp. 1–11. doi: 10.1002/psc.3193.



Sarin, V. K. *et al.* (1981) 'Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction', *Analytical Biochemistry*, 117(1), pp. 147–157. doi: 10.1016/0003-2697(81)90704-1.

Seshadri, S. *et al.* (2018) 'Altered avalanche dynamics in a developmental NMDAR hypofunction model of cognitive impairment', *Translational Psychiatry*. Springer US, 8(1). doi: 10.1038/s41398-017-0060-z.

Shen, M. and Sali, A. (2006) 'Statistical potential for assessment and prediction of protein structures', *Protein Science*, 15(11), pp. 2507–2524. doi: 10.1110/ps.062416606.

Singh, S. *et al.* (2015) 'PEPstrMOD: Structure prediction of peptides containing natural, non-natural and modified residues', *Biology Direct*. Biology Direct, 10(1), pp. 1–19. doi: 10.1186/s13062-015-0103-4.

Smothers, C. T., Jin, C. and Woodward, J. J. (2013) 'Deletion of the N-terminal domain alters the ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in a subunit-dependent manner', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 37(11), pp. 1882–1890. doi: 10.1111/acer.12168.

Sobolevsky, A. I. (2015) 'Structure and gating of tetrameric glutamate receptors', *Journal of Physiology*, 593(1), pp. 29–38. doi: 10.1113/jphysiol.2013.264911.

Soto, D. *et al.* (2019) 'L-Serine dietary supplementation is associated with clinical improvement of loss-of-function GRIN2B-related pediatric encephalopathy', *Science Signaling*, 12(586), pp. 1–16. doi: 10.1126/scisignal.aaw0936.

Srinivasan P. Venkatachalan, Jeremy D. Bushman, José L. Mercado, Feyza Sancar, K. and R. Christopherson, and A. J. B. (2007) 'Optimized expression vector for ion channel studies in *Xenopus* oocytes and mammalian cells using alfalfa mosaic virus', 454(1), pp. 155–163. doi: 10.1007/s00424-006-0183-1.Optimized.

Stroebe, D. *et al.* (2014) 'Controlling NMDA receptor subunit composition using ectopic retention signals', *Journal of Neuroscience*, 34(50), pp. 16630–16636. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2736-14.2014.

Stroebe, D. *et al.* (2016) 'A novel binding mode reveals two distinct classes of NMDA receptor GluN2B-selective antagonists', *Molecular Pharmacology*, 89(5), pp. 541–551. doi: 10.1124/mol.115.103036.

Stroebe, D., Casado, M. and Paoletti, P. (2018) 'Triheteromeric NMDA receptors: from structure to synaptic physiology', *Current Opinion in Physiology*, 2, pp. 1–12. doi: 10.1016/j.cophys.2017.12.004.

Swanger, S. A. *et al.* (2016) 'Mechanistic Insight into NMDA Receptor Dysregulation by Rare Variants in the GluN2A and GluN2B Agonist Binding Domains', *American Journal of Human Genetics*, 99(6), pp. 1261–1280. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.10.002.

Tabish, M. and Ticku, M. K. (2004) 'Alternate splice variants of mouse NR2B gene', *Neurochemistry International*, 44(5), pp. 339–343. doi: 10.1016/S0197-0186(03)00171-2.

- Tajima, N. *et al.* (2016) 'Activation of NMDA receptors and the mechanism of inhibition by ifenprodil', *Nature*. Nature Publishing Group, 534(7605), pp. 63–68. doi: 10.1038/nature17679.
- Tam, J. P., Riemen, M. W. and Merrifield, R. B. (1988) 'Mechanisms of aspartimide formation: the effects of protecting groups, acid, base, temperature and time.', *Peptide research*, 1(1), pp. 6–18.
- Traynelis, S. F. *et al.* (2010) 'Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function', *Pharmacological reviews*, 62(3), pp. 406–496. doi: 10.1124/pr.109.002451.405.
- Trott, O. and Olson, A. J. (2009) 'AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading', *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), p. NA-NA. doi: 10.1002/jcc.21334.
- Twomey, E. C. and Sobolevsky, A. I. (2018) 'Structural Mechanisms of Gating in Ionotropic Glutamate Receptors', *Biochemistry*, 57(3), pp. 267–276. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00891.
- Valeur, E. and Bradley, M. (2009) 'Amide bond formation: Beyond the myth of coupling reagents', *Chemical Society Reviews*, 38(2), pp. 606–631. doi: 10.1039/b701677h.
- Vicini, S. *et al.* (1998) 'Functional and pharmacological differences between recombinant N- methyl-D-aspartate receptors', *Journal of Neurophysiology*, 79(2), pp. 555–566. doi: 10.1152/jn.1998.79.2.555.
- Vieira, M. *et al.* (2020) 'Regulation of NMDA glutamate receptor functions by the GluN2 subunits', *Journal of Neurochemistry*, (September 2019), pp. 1–23. doi: 10.1111/jnc.14970.
- Volgraf, M. *et al.* (2016) 'Discovery of GluN2A-Selective NMDA Receptor Positive Allosteric Modulators (PAMs): Tuning Deactivation Kinetics via Structure-Based Design', *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(6), pp. 2760–2779. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b02010.
- Volk, L. *et al.* (2015) 'Glutamate Synapses in Human Cognitive Disorders', *Annual Review of Neuroscience*, 38(1), pp. 127–149. doi: 10.1146/annurev-neuro-071714-033821.
- Wang, H. *et al.* (2021) 'Gating mechanism and a modulatory niche of human GluN1-GluN2A NMDA receptors', *Neuron*. Elsevier Ltd, 109(15), pp. 2443-2456.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2021.05.031.
- Wang, W. (2021) 'Recent advances in atomic molecular dynamics simulation of intrinsically disordered proteins', *Physical Chemistry Chemical Physics*. Royal Society of Chemistry, 23(2), pp. 777–784. doi: 10.1039/d0cp05818a.
- Waqar, M. and Batool, S. (2017) 'In silico analysis of binding interaction of conantokins with NMDA receptors for potential therapeutic use in Alzheimer's disease', *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 23(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s40409-017-0132-9.
- Watford, M. (2015) 'Glutamine and glutamate: Nonessential or essential amino acids?', *Animal Nutrition*. Elsevier, 1(3), pp. 119–122. doi: 10.1016/j.aninu.2015.08.008.

Wenthold, R. J. *et al.* (2003) 'Trafficking of NMDA Receptors', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43, pp. 335–358. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135803.

Wiederstein, M. and Sippl, M. J. (2007) 'ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins', *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2), pp. 407–410. doi: 10.1093/nar/gkm290.

Wyllie, D. J. A., Livesey, M. R. and Hardingham, G. E. (2013) 'Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function', *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd, 74, pp. 4–17. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.01.016.

Xianqiang Song, Morten Ø. Jensen, Vishwanath Jogini, Richard A. Stein, Chia-Hsueh Lee, Hassane S. Mchaourab, D. E. S. and E. G. (2018) *Mechanism of NMDA receptor channel block by MK-801 and memantine*, *HHS Public Access*. doi: 10.1002/jmri.25711.PET/MRI.

Yamamoto, H. *et al.* (2015) 'Specific Roles of NMDA Receptor Subunits in Mental Disorders', *Current Molecular Medicine*, 15(3), pp. 193–205. doi: 10.2174/1566524015666150330142807.

Yashiro, K. and Philpot, B. D. (2008) 'Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity', *Neuropharmacology*, 55(7), pp. 1081–1094. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.07.046.

Yi, F. *et al.* (2020) 'PTC-174, a positive allosteric modulator of NMDA receptors containing GluN2C or GluN2D subunits', *Neuropharmacology*. Elsevier, (January), p. 107971. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.107971.

Yu, A. and Lau, A. Y. (2018) 'Glutamate and Glycine Binding to the NMDA Receptor', *Structure*. Elsevier Ltd., 26(7), pp. 1035-1043.e2. doi: 10.1016/j.str.2018.05.004.

Yuan, Y. *et al.* (2016) 'Discerning the Role of the Hydroxyproline Residue in the Structure of Conantokin RI-B and Its Role in GluN2B Subunit-Selective Antagonistic Activity toward N-Methyl-d-Aspartate Receptors', *Biochemistry*, 55(51), pp. 7112–7122. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00962.

Zhou, Y. and Danbolt, N. C. (2014) 'Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain', *Journal of Neural Transmission*, 121(8), pp. 799–817. doi: 10.1007/s00702-014-1180-8.

Zhu, S. *et al.* (2016) 'Mechanism of NMDA Receptor Inhibition and Activation', *Cell*. Elsevier Inc., 165(3), pp. 704–714. doi: 10.1016/j.cell.2016.03.028.