



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MECANISMOS MOLECULARES ASOCIADOS CON LA
REGULACIÓN DEL RECEPTOR NMDA EN LA
MEMORIA ESPACIAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

ILSE DELINT RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. FEDERICO BERMÚDEZ-RATTONI

México, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos y dedicatorias

A mis padres, mis abuelos, mi hermano y mis otros hermanos, a todos mis tíos y primos, gracias por todo su apoyo y por haberme dado la mejor familia que puede existir.

A Alberto, gracias por apoyarme en cada momento y por ser mi pareja, mi amigo, mi amante, mi cómplice, mi novio y también mi esposo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad que me ha brindado para desarrollarme tanto en lo académico como en lo personal.

Al Dr. Federico Bermúdez Rattoni, por su apoyo para realizar el doctorado y por la libertad que siempre me dio dentro de su laboratorio.

A mi comité tutor, el Dr. Ricardo Tapia y el Dr. Gabriel Gutiérrez por sus valiosos consejos a través de todo el doctorado.

A la Dra. Clorinda Arias, al Dr. Jesús Chimal, y al Dr. Rogelio Arellano por la revisión de este texto y sus valiosos comentarios, en especial a la Dr. Ana María López Colomé porque además de esto, ha sido una segunda tutora durante el doctorado.

Al Dr. Seth Grant del Instituto Sanger Wellcome Trust por darme la oportunidad y el apoyo para realizar una estancia en su laboratorio, durante la cual realicé muchos de los experimentos de esta tesis.

A todos los compañeros del laboratorio en el Instituto Sanger, principalmente a Alex Bayes, Marcelo Coba y Rachel Uren por su ayuda y amistad.

A todos mis amigos del Distrito Federal y de Uruapan, en especial a las palomas de maíz Karla y Vania.

A Pamela, porque tuve la suerte de que fuera mi alumna y con quien realicé parte del trabajo de esta tesis siempre riendo.

A todos mis compañeros y amigos de laboratorio con quien he convivido durante este doctorado, la lista es grande pero principalmente a Kioko, Perla, a los Luises en especial a Nuñez, también a Royero, Rodrigo, Pascal, Azul, Paola, Julio, Israela y Carlos. Gracias por tantos momentos, tanto fuera como dentro del laboratorio. Por último gracias a Vanesa a la que nunca olvidaremos los que tuvimos la suerte de conocer y tener su amistad.

Al Instituto de Fisiología Celular y a toda las personas que laboran en él, entre ellos Yolanda Días, Adriana Morales y Sara Noguera por su ayuda durante todos estos años.

A Oreste Carvajal por su asistencia técnica. Este estudio fue apoyado por CONACYT-México a través del proyecto 060478 y DGAPA-UNAM IN-220706.

“El hombre en su arrogancia se cree la obra de arte de una deidad”
Charles Darwin

“Lo importante es no dejar de hacer preguntas”
Albert Einstein

“Siempre hay que pensar antes de creer cualquier cosa”
Mi abuelo Jesús Ramírez Rodríguez

Índice

ÍNDICE	4
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
El receptor de glutamato NMDA	8
La fosforilación del receptor NMDA	10
El receptor NMDA y la plasticidad sináptica	13
Redistribución del receptor NMDA en plasticidad sináptica	14
Tráfico del receptor NMDA desde los sitios de síntesis	14
Ubicación sináptica y extrasináptica.	17
Internalización del receptor NMDA	19
Movilidad lateral	20
Los microdominios lipídicos de la membrana.	21
Los microdominios lipídicos en el sistema nervioso.	23
Sistemas de transducción que dependen de microdominios lipídicos.	24
Los microdominios lipídicos en la sinapsis.	26
Receptores para los neurotransmisores	28
Los receptores NMDA y los microdominios de membrana.	29
Los receptores NMDA y la memoria espacial.	30
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
HIPÓTESIS	33
OBJETIVO GENERAL	33
OBJETIVO ESPECÍFICOS	33
MÉTODOS	34
Entrenamiento	34
Aislamiento de los microdominios lipídicos	35
Aislamiento de sinaptosomas, microdominios sinápticos y densidad postsináptica.	36
Inmunoprecipitación	37
Western Blot	38

RESULTADOS	39
Curva de aprendizaje en el laberinto acuático de Morris.	39
El entrenamiento espacial incrementó la fosforilación en tirosinas de la subunidad NR2B	40
En entrenamiento incrementó la concentración de los receptores NMDA en los microdominios lipídicos	45
La concentración total los receptores NMDA en los sinaptosomas no cambió	47
Incremento de receptores NMDA y PSD-95 en los microdominios lipídicos y disminución en la PSD obtenida de sinaptosomas.	51
El entrenamiento espacial también indujo reclutamiento de receptores NMDA en el hipocampo.	56
La supresión génica de PSD-95 no redujo la asociación del receptor NMDA con los microdominios lipídicos	58
La supresión génica de PSD-93 no disminuyó la asociación del receptor NMDA con los microdominios lipídicos	62
La eliminación de la valina 1482 de la subunidad NR2B afectó la asociación del receptor NMDA con los microdominios.	64
La eliminación del dominio carboxilo terminal de la subunidades NR2A redujo la asociación de los receptores NMDA con los microdominios lipídicos	68
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	87
ANEXO	95

Introducción

El receptor de glutamato NMDA

El glutamato es uno de los principales neurotransmisores excitadores en el sistema nervioso de los mamíferos, es liberado de terminales nerviosas presinápticas y activa tres clases principales de receptores ionotrópicos llamados NMDA (N-metil-d-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato) y kainato. El glutamato activa también una familia de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (mGluRs). Los receptores NMDA generan una corriente catiónica con una cinética muy lenta. Son altamente permeables a iones Ca^{2+} y también conducen Na^+ y K^+ ¹. Los receptores AMPA y kainato permiten el flujo de iones Na^+ principalmente, pero no Ca^{2+} , por lo cual el efecto de su activación es muy distinto, ya que el Ca^{2+} que conduce el receptor NMDA es el segundo mensajero más importante.

Para la activación de los receptores NMDA se requiere la unión tanto del glutamato como de la glicina como coagonista. El receptor también está regulado por la unión de poliaminas así como H^+ , y Zn^{2+} . Bajo el potencial de membrana en reposo, los iones de Mg^{2+} se unen al canal bloqueando el flujo de cationes, es necesaria una despolarización de la membrana para liberar el Mg^{2+} permitiendo el flujo de iones ¹.

Se han identificado tres principales familias de subunidades del receptor NMDA: la ampliamente expresada NR1: una familia de cuatro distintas subunidades NR2 (NR2A, 2B, 2C y 2D); y la familia compuesta por dos subunidades NR3 (NR3A y NR3B). Todos los receptores NMDA parecen funcionar como ensamblajes heteroméricos, compuestos de dos subunidades NR1 en combinación con al menos un tipo de subunidades NR2 ². Las subunidades NR3

pueden co-ensamblar con los complejos NR1/NR2. Las subunidades NR2A y NR2B son las más importantes y ampliamente distribuidas en el cerebro adulto, ya que NR2C está prácticamente restringida al cerebelo y la retina, mientras que NR2D se expresa principalmente durante el desarrollo embrionario del cerebro^{3,4}. El sitio de unión del glutamato está formado por los dominios de las subunidades NR2 mientras que el de la glicina se localiza en dominios de las subunidades NR1¹. La co-expresión de las subunidades NR3 con los complejos NR1/NR2 causa una marcada reducción en la conductancia del canal. Al parecer esta familia de subunidades tiene una función reguladora durante el desarrollo temprano, sin embargo no ha sido estudiada a fondo¹.

La subunidad NR1 está codificada por un solo gen (Grin1) con tres exones alternativos. El exón 5 codifica una región en el dominio N-terminal extracelular llamado N1 y los exones 21 y 22 codifican las regiones C1 y C2 del dominio C-terminal intracelular⁵. La presencia o ausencia de los casetes N1 y C1, más la codificación alternativa de una región C2' en lugar de C2, producen 8 distintas isoformas del receptor (NRI-1a, -1b, -2a, -2b, -3a, -3b, -4a y -4b)⁵. El casete N1 regula características del receptor como su inhibición por protones, potenciación por poliamidas e inhibición por Zn²⁺. Los casetes C1 y C2 regulan aspectos relacionados con el tráfico intracelular que serán tratados posteriormente^{6,7}.

Las subunidades NR2A, B, C y D son codificadas por genes llamados Grin2A, B, C, y D respectivamente, estos genes son homólogos entre sí (aproximadamente 50% de identidad) pero solo tienen un 15% de identidad con el gen que codifica para la subunidad NR1⁸.

Las diferentes subunidades de la familia NR2 le confieren al receptor diferentes propiedades farmacológicas y cinéticas². Entre estas propiedades están

el curso temporal de activación/desactivación del canal. Los receptores compuestos por NR1/NR2B tienen un tiempo de decaimiento más lento, como consecuencia tienen una mayor conductancia, mientras que los receptores NR1/NR2C o NR1/NR2D tienen una cinética de desactivación mucho más rápida. El bloqueo por Mg^{2+} también es afectado la diferente composición de subunidades. Los receptores de baja conductancia compuestos por NR1/NR2C o NR1/NR2D, exhiben una reducida sensibilidad al bloqueo por el Mg^{2+} ⁹.

Las subunidades NR2 tienen un dominio carboxilo terminal muy largo que se extiende en el citoplasma. Este dominio también es muy importante en la regulación del receptor ya que diferentes proteínas interactúan directamente con este dominio carboxilo terminal de las subunidades NR2, entre estas proteínas se encuentran por ejemplo: cinasas, fosfatasas, proteínas de andamiaje, de citoesqueleto y proteasas ¹⁰⁻¹².

La fosforilación del receptor NMDA

Estudios electrofisiológicos muestran que la conductancia del receptor NMDA está determinada por un balance entre la fosforilación mediada por diversas cinasas (PKC, PKA, CaMKII, Cdk5 y las cinasas de la familia Src), así como por la desfosforilación mediada por las fosfatasas, actuando sobre residuos de tirosina o serina/treonina de los dominios carboxilo terminal de las subunidades. Generalmente la activación de cinasas incrementa el flujo de corriente a través del canal, mientras que su inhibición lo disminuye ¹³⁻¹⁷. Sin embargo, el efecto de la fosforilación no es simple y afecta también otras propiedades del receptor además de su conductancia unitaria, lo cual se explicará a continuación.

La subunidad NR2B es una de las proteínas fosforiladas más abundantes en las neuronas ¹⁸. La tirosina 1472 es el principal sitio de fosforilación de la subunidad NR2B ¹⁹. El nivel de ésta fosforilación se incrementa después de la inducción de LTP (potenciación de largo plazo) en el hipocampo, también se incrementa después de la inducción de la isquemia o la exposición a etanol ¹⁷. La fosforilación en Tyr-1472 no regula la apertura del canal, pero regula su localización. En ciertas condiciones incrementa el transporte de las subunidades NR2 a la superficie celular mientras que la mutación de este residuo coloca al receptor en la región periférica de la sinapsis ²⁰. La subunidad NR2B tiene dos tirosinas más Y1336 y Y1252, que pueden ser fosforiladas por las cinasas de la familia Src. El sitio Y1336 ha sido relacionado con el incremento en la proteólisis dependiente de la proteasa calpaina sobre la región carboxilo terminal de las subunidades NR2A y NR2B. Los datos indican que esta fosforilación está mediada específicamente por la cinasa Fyn y no por Src (ambas son cinasas de la familia Src) ²¹. Esta proteólisis representa un mecanismo de retroalimentación negativa dependiente de actividad, ya que el calcio que entra a través del receptor NMDA conduce a la activación de la calpaína ^{21, 22}. La subunidad NR2A también tiene 3 tirosinas Y1292, Y1387 y Y1325, que pueden ser fosforiladas por cinasas de la familia Src. No se conoce de manera diferencial como se regulan estos sitios de fosforilación, sin embargo, la fosforilación global está relacionada con el incremento en la conductividad del canal.

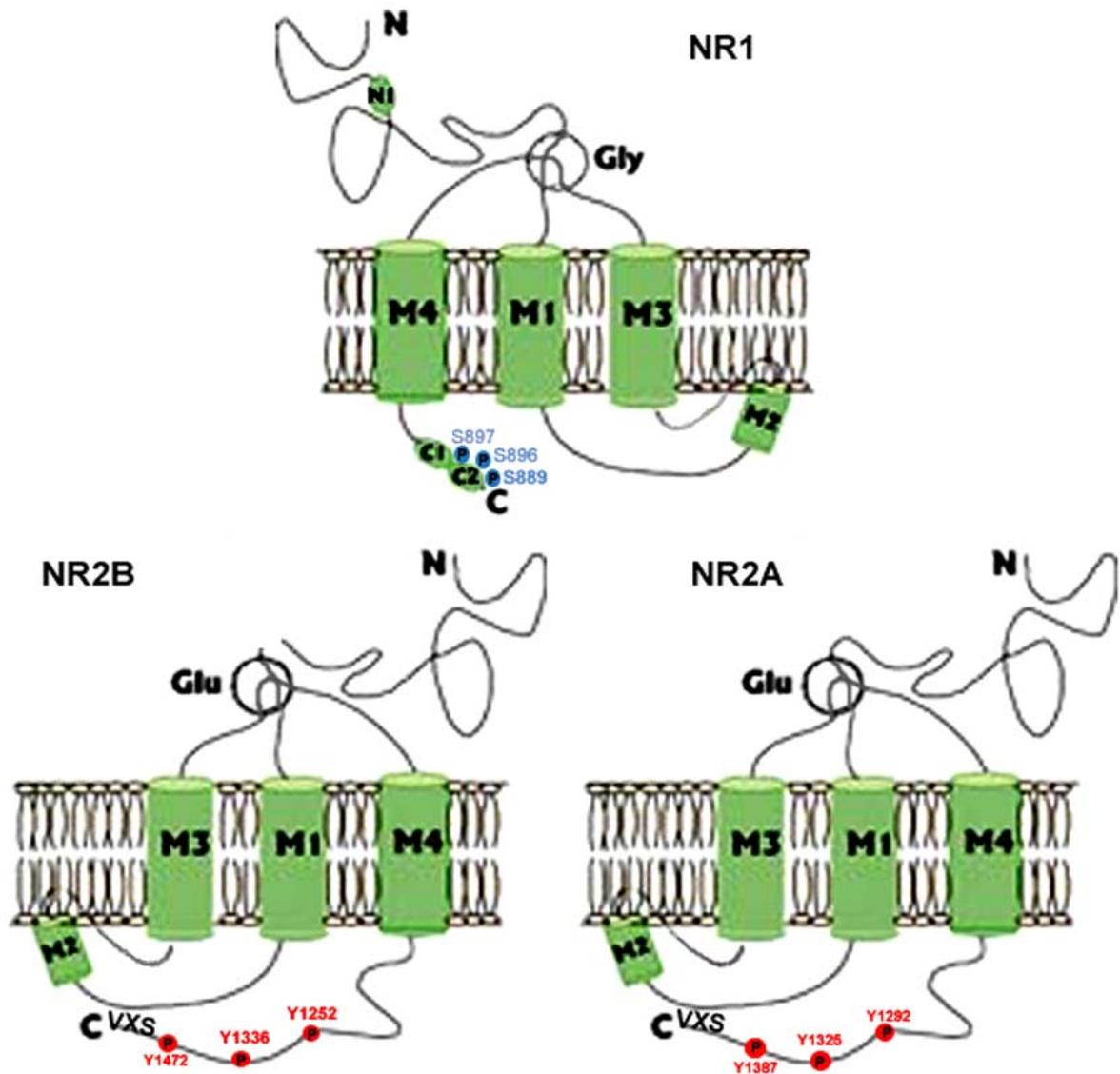


Figura 1. Representación esquemática del receptor NMDA. Se muestra en verde los dominios membranales (M) y las regiones de la subunidad NR1 (N1, C1 y C2) que se intercambian mediante el empalme alternativo de exones. En rojo se muestran los sitios de fosforilación en tirosinas de las subunidades NR2 y en azul las serinas fosforilables de la subunidad NR1.

El receptor NMDA y la plasticidad sináptica

Como se mencionó anteriormente, para que se active el receptor NMDA, es necesaria una despolarización de la membrana para liberar el bloqueo del Mg^{2+} . Debido a esta característica se dice que este receptor es un detector de coincidencia ya que permite el flujo de iones solo cuando son excitadas al mismo tiempo tanto la célula presináptica como la postsináptica ¹. Se propone que las características del receptor NMDA, principalmente ésta última, le confieren la propiedad de ser el más importante inductor de plasticidad sináptica. La plasticidad es la propiedad de cambiar la eficiencia sináptica con la cual las neuronas se comunican, y es la base del almacenamiento de información en el cerebro, es decir, del aprendizaje y la memoria. En los últimos años se ha reunido una gran cantidad de evidencia que confirma que las memorias pueden ser guardadas gracias a pequeñas modificaciones que cambian ya sea en fuerza o en número a las sinapsis. Estas modificaciones ocurren por la actividad repetida ²³.

Existen diferentes tipos de memoria que involucran a diferentes sistemas neuronales en el cerebro ²⁴. Larry Squire en el año de 1987 basado en estudios realizados en humanos y otros primates, propuso dividir la memoria con base en la naturaleza de la información. La dividió en declarativa y no declarativa. La memoria declarativa, también denominada explícita, se refiere a la capacidad de recolección de significados, hechos y eventos de manera “consciente” ²⁵. En la memoria declarativa se forman asociaciones entre dos estímulos diferentes. La memoria declarativa está diseñada para representar objetos y eventos del mundo exterior y las relaciones entre ellos. La memoria no-declarativa, también llamada implícita, es inconsciente y se refiere a la colección heterogénea de habilidades motoras, hábitos, y sensaciones ^{26 27}.

La memoria también se puede dividir de acuerdo a su duración, en memoria a corto plazo y la memoria de largo plazo. La mayoría de los investigadores coinciden en que la memoria llamada de corto plazo puede durar de minutos a horas y la de largo plazo puede durar por varios meses o incluso por toda la vida del individuo, pero la principal diferencia es que la formación de la memoria de largo plazo requiere cambios en la síntesis proteica, mientras que la de corto plazo no requiere de ello ²⁸. Numerosos estudios han mostrado que el receptor NMDA interviene en la formación de la memoria tanto de corto como de largo plazo. Durante la formación de la memoria se han descrito cambios en su estado de fosforilación y en la composición de subunidades del receptor ^{1, 9}. Sin embargo, estudios recientes demuestran que otro de los mecanismos que podría regular la función del receptor NMDA en procesos de plasticidad sináptica es su distribución en la neurona.

Redistribución del receptor NMDA en plasticidad sináptica

Tráfico del receptor NMDA desde los sitios de síntesis

Durante la estabilización de la sinapsis, las subunidades de los receptores NMDA recientemente sintetizadas deben madurar, ser ensambladas en el retículo endoplasmático (RE), y los receptores ser transportadas a través de la vía secretora Golgi-RE y la vía vesicular e insertadas directamente en la sinapsis ^{3, 4, 29}. Sin embargo, algunos estudios han mostrado inserción de receptores NMDA en la membrana plasmática extrasináptica de la dendrita, y difusión lateral hacia los sitios de contacto sináptico como otro mecanismo para la incorporación de receptores NMDA en la sinapsis ^{30, 31}.

Son muchos los factores que regulan este transporte y distribución entre ellos el tipo de variante de empalme de la subunidad NR1. Como se mencionó anteriormente, existen 8 variantes de empalme, 4 de las cuales tienen el casete C1. Varios estudios han identificado una secuencia señal de retención en el RE (RxR) dentro del casete C1. Esta secuencia está ubicada en el dominio que se localiza en el lumen del RE de proteínas multi-transmembranales, y actúa como una señal de retención en el retículo, para que estas proteínas no sean transportadas a la membrana citoplasmática, sino que son retenidas en el RE ⁴. La evidencia sugiere que esta secuencia puede operar como un mecanismo que retiene a las subunidades del receptor NMDA antes de ser ensambladas. Sin embargo, las subunidades que no tienen el casete C1, pueden ser transportadas e insertadas en la membrana celular de células heterólogas ³²⁻³⁴. Las subunidades NR2 tampoco se localizan en la membrana celular sin la expresión de subunidades NR1, sin embargo, cuando ambas subunidades se expresan simultáneamente, son eficientemente liberadas hacia la membrana celular ³⁵. Los estudios sugieren que el encubrimiento de la señal de retención RxR, cuando está ensamblada con las otras subunidades promueve el tráfico del receptor NMDA a la sinapsis.

Las neuronas tienen un exceso de subunidades NR1 en comparación con la cantidad de subunidades NR2. Este reservorio de subunidades NR1 que no están ensambladas con NR2, no alcanza la superficie celular, lo cual sugiere que la disponibilidad de subunidades NR2 puede ser un factor limitante en la inserción de receptores en la sinapsis ⁴. La inserción de receptores en la membrana sináptica mediante este mecanismo ha sido reportada en la corteza visual de las ratas neonatas, en la cual la apertura de los ojos regula la expresión de subunidades NR2, e induce la rápida inserción de receptores NMDA en la sinapsis sin cambiar la

expresión de receptores NR1. Este efecto requiere solo de una hora de experiencia visual, la actividad de los receptores NMDA y síntesis de nuevas proteínas. La síntesis de nuevas subunidades NR2 en procesos de plasticidad puede ser muy rápida. Un incremento en los niveles totales de proteínas NR2A se ha encontrado después de tan solo 20 minutos después de la inducción de plasticidad sináptica ³⁶.

El casete C2' también regula el tráfico del receptor NMDA. Este casete tiene una secuencia de unión a dominios PDZ (dominio llamado así porque se descubrió en tres proteínas PSD-95,DlgA y Zo-1) que puede desactivar la secuencia RxR en el casete C1, promoviendo la movilización del receptor NMDA del RE. Al parecer, esta desactivación resulta del enmascaramiento de la secuencia RxR por la interacción con proteínas que poseen dominios PDZ con el casete C2', como la proteína de andamiaje PSD-95, la cual puede inhibir la maquinaria de retención del RE ³³. PSD-95 es una proteína miembro de la familia MAGUK (quinasas de guanilato asociadas a membrana). La interacción entre la subunidades del receptor y los dominios PDZ que tienen las proteínas de la familia MAGUK tienen un papel importante en el direccionamiento de los receptores hacia la sinapsis y la señalización intracelular, varios estudios han mostrado que la secuencia carboxilo terminal T/SXV de las subunidades NR2A y NR2B pueden directamente interactuar con los dominio PDZ de PSD-95, SAP-102 y PSD-93 y que tal interacción induce la formación de conjuntos de receptores NMDA en la membrana ^{37, 38}.

Se ha demostrado que la regulación del tráfico del receptor NMDA tiene un papel importante en la durante la plasticidad sináptica también en la rata adulta. En las ratas adultas se ha visto que existe un reservorio substancial de receptores NMDA intracelulares (NR1, NR2A y NR2B) disponible para su reclutamiento en la membrana sináptica. La inducción de LTP produce una inserción rápida de

receptores NMDA en la membrana plasmática (15 min). Se observó que este proceso está mediado por PKC y las cinasas de la familia Src, y el reclutamiento a la membrana es exclusivo de receptores que contienen el casete C2. Por lo tanto, se propone que existen dos poblaciones de receptores con subunidades NR1, una constitutivamente presente en la membrana (receptores que contienen la subunidad C2') y una segunda población (receptores que contienen el casete C2) disponible para ser reclutada después de una estimulación de alta frecuencia ³⁹. Otro estudio en rata adulta mostró que la inducción de LTD correlaciona con un decremento tanto de receptores AMPA como NMDA en la fracción sinaptoneurosomal, sin cambios en la cantidad total de receptores ⁴⁰.

Existen más ejemplos de tráfico de receptores NMDA dependiente de actividad. Un estudio realizado en cultivos de hipocampo, demuestra que la inhibición crónica del receptor, incrementa la cantidad de receptores NMDA sinápticos, esto se da mediante un incremento en la síntesis de las subunidades NR2, mientras que la cantidad total de subunidades NR1 permanece constante ⁴¹.

Otro estudio mostró que la acumulación sináptica de receptores NMDA inducida también por un día de bloqueo crónico no requiere de la síntesis de nuevas subunidades del receptor, mientras que la acumulación de receptor después de largos periodos de bloqueo si depende de la síntesis de nuevas proteínas. También se observó que este efecto es dependiente de PKA ⁴²

Ubicación sináptica y extrasináptica.

Los receptores NMDA se localizan tanto en regiones sinápticas como extrasinápticas. La liberación multivesicular o estímulos de alta frecuencia producen la difusión del glutamato fuera de la hendidura sináptica resultando en la activación

de los receptores y de las cascadas de señalización tanto sinápticas como extrasinápticas ². La inclusión de corrientes a través de receptores extrasinápticos en una respuesta evocada parece variar acorde a la localización, actividad y grado de saturación de los transportadores neuronales y gliales ⁴³.

Los receptores NMDA se unen a la densidad postsináptica (PSD) la cual es un complejo macromolecular de señalización intracelular con una gran cantidad de proteínas adaptadoras y de andamiaje que está en contacto con la membrana sináptica. Los estudios muestran que los receptores NMDA sinápticos y extrasinápticos se asocian con diferentes proteínas de andamiaje de una manera muy dinámica. Una de las hipótesis que se manejan es que en sinapsis maduras, los receptores que contienen NR2A están en su mayoría unidos a PSD-95 y localizados principalmente en la densidad postsináptica, mientras que los receptores con subunidades NR2B unen a SAP-102 localizados en membrana perisináptica y extrasináptica ^{44 9, 45}, sin embargo esta localización cambia durante el desarrollo embrionario ya que la subunidad NR2B y SAP-102 predominan en las neuronas neonatales localizados en la membrana postsináptica. La expresión de NR2A y PSD-95 gradualmente se incrementa durante la segunda y tercera semanas después del nacimiento. La evidencia sugiere que la actividad induce este cambio en la proporción subunidades ya que detona la rápida inserción de receptores NMDA con mayor proporción de subunidades NR2A mientras que los receptores que contenían NR2B unidos a SAP102 son desplazados en la extrasinapsis ^{36, 45}. Este intercambio acorta la duración de la corriente sináptica mediada por el receptor NMDA lo cual tienen un efecto en las propiedades de la plasticidad sináptica ^{2, 46}. La disminución de la corriente del receptor altera el umbral LTP-LTD, incrementando la probabilidad de inducción de LTD con respecto a la de

LTP en respuesta a un estímulo ^{2, 46}. Esto implica que la localización de las diferentes subunidades del receptor NMDA regulan procesos de metaplasticidad, cambios dependientes de actividad en la habilidad de inducir una subsiguiente cambio plástico ⁴⁷.

Internalización del receptor NMDA

Los receptores NMDA son internalizados principalmente por endocitosis mediada por clatrina. La internalización constitutiva del receptor es baja, cerca del 5% ⁴⁸, sin embargo puede ser modulada. Se ha encontrado que la endocitosis de las subunidades NR2A es más lenta que las de las subunidades NR2B lo cual depende de la región carboxilo terminal. Las subunidades NR2B después de su internalización preferentemente se localizan en endosomas de reciclaje. Mientras que las subunidades NR2A son degradados en endosomas tardíos ⁴⁹.

La subunidad NR2B tiene una secuencia de internalización YEKL en la región distal del carboxilo terminal. Esta secuencia se une directamente a la proteína adaptadora la AP-2, la cual forma parte de un complejo proteico que une proteínas de membrana a la clatrina. La unión de dominios PDZ al NR2B inhibe la asociación con AP-2 ⁵⁰. Por lo cual se propone un modelo en que el receptor NMDA se asocia con la PSD a través de las proteínas de la familia MAGUK, la perturbación de este complejo desestabiliza al receptor NMDA y permite la unión de la AP-2 su la rápida internalización ⁵¹.

Otras secuencias relacionadas con la internalización del receptor se localizan en subunidades NR1 y NR2, pertenecen a una familia conservada de señales de endocitosis proximales a la membrana. Esta región ha sido implicada en reducción del receptor dependiente de actividad. La internalización mediada por este tipo de

dominios conduce selectivamente a los receptores a endosomas tardíos y acelera su degradación ⁵². En esta internalización también contribuye la tirosina 837 del NR1 y la 842 del NR2A. La desfosforilación de estas tirosinas incrementa la afinidad por AP-2. Se ha reportado que la unión del agonista media esta desfosforilación independiente del flujo de iones a través del receptor ⁵³. De esta forma el receptor NMDA puede ser modulado por bajos niveles de actividad, disminuyendo su número en la sinapsis, lo cual ha sido reportado después de la inducción de LTD ⁴⁰.

Movilidad lateral

Varios estudios han mostrado que el receptor NMDA en la membrana plasmática no está anclado permanentemente a la PSD sino que es altamente dinámico. La movilidad lateral entre las regiones sinápticas y extrasinápticas ha sido propuesta como un mecanismo que puede cambiar la transmisión sináptica en pocos segundos. Estudios en neuronas hipocámpales marcando los receptores NMDA que están en la sinapsis, demostraron que los receptores en la membrana se mueven lateralmente entre las áreas sinápticas y extrasinápticas ³¹. Esta movilidad podría ser regulada por cinasas activadas durante los procesos de plasticidad sináptica. La fosforilación en la serina 890 dentro del casete C1 del NR1 por PKC evita la formación de agregados membranales del receptor e induce la rápida dispersión de los receptores NMDA hacia la membrana extrasináptica ⁵⁴. Otro estudio en donde siguen el desplazamiento sobre la membrana de receptores unitarios mostró que la activación de PKC incrementa la movilidad lateral del receptor (500%) dentro de los sitios sinápticos, pero mayormente en la membrana extrasináptica (1200%) ⁵⁵.

Los microdominios lipídicos de la membrana.

Otro mecanismo de movilidad en el plano de la membrana que podría regular la funcionalidad del receptor NMDA es su movilización hacia microdominios lipídicos. Estos microdominios son regiones membranales enriquecidas en colesterol, esfingolípidos y glicoesfingolípidos. Esta composición lipídica le confiere la característica de ser insolubles en detergentes no iónicos como el Tritón X-100. El rígido esqueleto hexagonal del colesterol promueve el empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos saturados permitiéndoles formar unidades cohesivas que flotan dentro de un ambiente más desordenado de lípidos insaturados ⁵⁶.

En estos microdominios también podemos encontrar proteínas, muchas de ellas tienen modificaciones postraduccionales que les permiten asociarse preferentemente a estos sitios en comparación con el resto de la membrana. Las proteínas que se anclan a glicosilfosfatidilinositol se asocian con la capa externa de la membrana, mientras que la palmitoilación y miristoilación de proteínas citosólicas les permiten asociarse con la capa interna. Se ha propuesto que estas regiones dentro de la membrana plasmática son importantes para la traducción de señales como un mecanismo de compartimentalización, pues se ha visto que en estas regiones hay 10 veces más proteínas involucradas en la transducción de señales (incluyendo a las cinasas de tirosina y serina) que en el resto de la membrana ⁵⁷; mientras que algunas proteínas como la fosfatasa transmembranal CD45 con excluidas de estos dominios ⁵⁸.

Estos microdominios lipídicos también son conocidos como balsas o en idioma inglés “rafts”, llamados así porque flotan en fracciones de baja densidad

durante la centrifugación en un gradiente de sacarosa por lo que este método es el más empleado para el aislamiento de los microdominios.

Varios estudios demuestran que al retirar colesterol de la membrana celular disipa los microdominios con lo cual se redistribuyen las proteínas que están en ellos, de fracciones solubles a fracciones insolubles en Tritón X-100 y de las fracciones ligeras a las fracciones densas en el gradiente de densidad de sacarosa

59-63

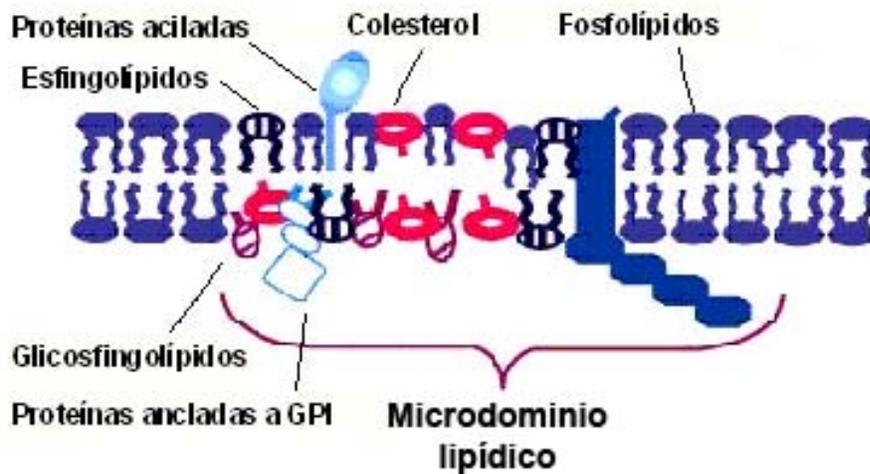


Figura 2. Composición de los microdominios lipídicos de membrana (Rafts)

Los microdominios lipídicos han sido estudiados mucho más extensamente en el sistema inmune. En la última década ha surgido evidencia de que la unión del ligando al receptor de las células B (BCR) así como a otros receptores del sistema inmune induce la translocación de los receptores hacia los microdominios como un evento clave para integración de la compleja red de señalización que se ha llamado sinapsis inmune y que guían la respuesta celular. Esta relocalización coloca al BCR en las proximidades de moléculas cruciales para la señalización las cuales se concentran en estos microdominios como la cinasa Lyn que lo fosforila (la fosforilación del BCR es el primer paso en su activación), y otras cinasas como Syk,

PKC, y PLCgamma que están cascada abajo en la señalización del receptor. Adicionalmente, dentro de los microdominios el BCR se mantiene aislado de las fosfatasa que lo desfosforilan como CD45⁶⁴. La asociación del BCR con los microdominios lipídicos es necesaria para la integración de una eficiente red de señalización que conduce a la proliferación celular. Cuando estos receptores son agregados fuera de los microdominios la señalización celular conduce a apoptosis^{65, 66}.

Los microdominios lipídicos en el sistema nervioso.

Recientemente varias proteínas que se localizan en la sinapsis han sido reportadas en estos microdominios incluyendo receptores NMDA, AMPA, GABA, acetilcolina, Trk, moléculas como PSD-95, ErbB4 (receptor del factor de crecimiento epidérmico), annexina II, CASK (cinasa de serina/treonina asociada a la calmodulina) y proteínas G pequeñas y triméricas, además de las cinasas de la familia Src^{60-62, 67-70}. También se ha visto que los microdominios son abundantes en dendritas y que son indispensables para el mantenimiento de la sinapsis y espinas dendríticas así como para la estabilidad de receptores en la membrana sináptica^{71, 72}. Se reporta que en la densidad postsináptica hay regiones que están asociadas a los microdominios y regiones asociadas a la membrana soluble^{59, 60}. Estudios recientes demuestran que los microdominios son importantes para la señalización por factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular, en la guía axonal y el tráfico vesicular^{68, 73, 74}. Los microdominios lipídicos también están involucrados en enfermedades neurodegenerativas pues intervienen en el procesamiento y oligomerización del péptido β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer⁷⁵⁻⁷⁸, y en el plegamiento de los priones en su estado patológico⁷⁹⁻⁸¹.

Sistemas de transducción que dependen de microdominios lipídicos.

No solo se ha descrito la ubicación de proteínas involucradas en crecimiento neurítico dentro de los microdominios, también se ha descubierto que esta ubicación es importante para regular la señalización intracelular inducida por estas proteínas, como las efrinas (el ligando membranal para el receptor Eph)⁸². Las efrinas y sus receptores regulan el movimiento celular, lo cual incluye guía de células migrantes y de conos de crecimiento neurales hacia blancos específicos. A pesar de no presentar un dominio intracelular la unión del receptor a la efrina es capaz de desencadenar un evento de señalización intracelular dentro de los microdominios. Se ha demostrado que esta señalización es dependiente de la integridad de los microdominios. Las efrinas al unirse a su receptor reclutan hacia los microdominios a las proteínas que están implicadas en la señalización e induce una fosforilación de al menos dos proteínas (p60 y p75-80) restringida a los microdominios⁸²⁻⁸⁴.

En el crecimiento neurítico también se ha descubierto la intervención de los microdominios lipídicos. Se ha reportado que la asociación de la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM) con los microdominios es crucial para la activación de esta cascada de señalización y la inducción del crecimiento neurítico. Existen datos que sugieren que las poblaciones de NCAM140 que se ubican fuera de los microdominios y las que se localizan dentro de ellos ejercen diferentes funciones. La activación de la NCAM140 que se localiza en los microdominios conduce a la fosforilación de la cinasa de adhesión focal FAK, principalmente por la activación de la cinasa Fyn, de manera dependiente de la actividad del receptor y reduce el transporte de los canales Kir3 a la superficie de la célula⁸⁵. Mientras que la activación de la población de NCAM140 fuera de los microdominios conduce la

activación de ERK. Ambas cascadas son necesarias para el crecimiento neurítico

⁸⁶.

La respuesta de guía axonal mediante otros factores de crecimiento también está regulada por la asociación de los receptores y de varias moléculas de señalización con los microdominios. En el año 2004 Guirland y su grupo encontraron en cultivos neuronales que el efecto quimio-atrayente del BDNF (Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro) y el efecto quimio-repulsor de la netrina-1 y la semaforina, colocados en un extremo de la preparación, podían ser eliminados mediante la perturbación de los microdominios con la aplicación de un quelante de colesterol (β -metil-ciclodextrina). Interesantemente este estudio también demuestra que los microdominios lipídicos se agrupan en la región que está en contacto con el estímulo. Sus datos también sugieren que la diferencia en la concentración de microdominios presentes en la región del cono de crecimiento que está recibiendo el estímulo y la región sin estimulación es lo que produce la respuesta polarizada del cono de crecimiento hacia el estímulo ^{68, 87}.

La señalización mediada por el factor neurotrófico derivados de glia GDNF ⁸⁸ ⁸⁹ y los factores de crecimiento epidérmico, neural y el derivado de plaquetas, (EGF, NGF, PDGF) también es dependiente de los microdominios lipídicos. Se ha visto que Pyk2 (cinasa de tirosina rica en prolina) y Cbl (ubiquitina-ligasa) forma un complejo con ArgBP2 (proteína de andamiaje) que se transloca a los microdominios, principalmente en los conos de crecimiento después de la estimulación con estos factores ^{90, 91}. Adicionalmente se ha demostrado que las neuronas que sobrepresaron el gangliósido GM1 (lo cual afecta a los microdominios) después del tratamiento con los factores de crecimiento respectivos mostraron una disminuida formación de dímeros y autofosforilación de los

receptores de PDGF y NGF, lo cual correlaciona con la disminución del crecimiento neurítico^{92, 93}. También se ha reportado que cuando las células PC12 en cultivo son tratadas con un quelante de colesterol o con un inhibidor de las cinasas de la familia Src, la estimulación con EGF induce crecimiento de neuritas en lugar de proliferación como ocurre en las células no tratadas. Consistente con este efecto la activación de Erk1/2 duró más tiempo en las células tratadas y la inhibición de Erk suprime este crecimiento neurítico⁹⁴. Estos resultados sugieren que el reclutamiento del receptor EGF en los microdominios evita su interacción con Erk. Cuando el receptor no puede ser reclutado a los microdominios, se produce la activación de Erk y la respuesta de la célula cambia de proliferación hacia crecimiento neurítico.

Toda esta evidencia sugiere que los microdominios funcionan como centros móviles de amplificación de señales que le permiten a la célula una polarización de la señal. Sin embargo, la localización de los complejos de transducción dentro de los microdominios al parecer también interviene en el tipo de respuesta que se va a desencadenar.

Los microdominios lipídicos en la sinapsis.

Aislar a los microdominios a partir de sinaptosomas permitió conocer algunas características de los microdominios sinápticos. Se encontró que la composición lipídica de los microdominios sinápticos es diferente a la composición de la densidad postsináptica. En los microdominios se encontró α -CaMKII, β -actina, drebina, α -tubulina, HSP 70 y 40, cadherina, y todas las subunidades de los receptores glutamatérgicos. Sin embargo, los receptores NMDA al igual que las proteínas adaptadoras PDS-95, SAP-70 y GRIP y las enzimas N-Shc, synGAP,

MAPKK, Erk2, CaMKII se localizaron mayormente en la densidad postsináptica. Interesantemente Ras solo se encontró en los microdominios. También los receptores para el factor de EGF, Grb2 y Sos1 fueron detectados exclusivamente en la fracción de los microdominios. ErbB3, RSK1 y TrkB el receptor para el BDNF se encontraron de manera equivalente en la fracción de los microdominios como en la densidad postsináptica ⁶¹. La proteína ribosomal S6 se encontró mayormente en la densidad postsináptica, sin embargo los factores de iniciación y elongación excepto el F5 fueron detectados predominantemente en microdominios ⁹⁵. Estos datos indican que la ubicación de las proteínas en los microdominios sinápticos les permite interactuar con proteínas diferentes a las que se asocian a la densidad postsináptica.

En estudios posteriores en cultivos neuronales se demostró que las neuronas poseen una variedad de microdominios con diferente composición. Se logró distinguir microdominios enriquecidos en Thy-1 y microdominios enriquecidos en caveolina (dos moléculas que se localizan casi exclusivamente en microdominios) con diferente patrón de flotación, PSD-95, NMDA y AMPA muestran un patrón de flotación similar al de caveolina y no de Thy-1. Esta última está más enriquecida en los axones lo cual podría sugerir que los diferentes compartimentos neuronales tienen diferente tipo de microdominios ^{96, 97}.

Adicionalmente, se ha demostrado que la reducción de colesterol mediante el uso de un inhibidor la síntesis de colesterol y esfingolípidos produce una reducción gradual el número de sinapsis y de espinas además de un agrandamiento de las sinapsis restantes con acumulación de proteínas sinápticas como los receptores NMDA y PSD-95. La supresión aguda mediante el uso de β -ciclodextrina ocasiona un colapso inmediato de la espina con la redistribución de la

actina hacia el eje dendrítico. Ya que los microdominios interactúan estrechamente con este citoesqueleto ⁹⁸, la eliminación de los podría debilitar la interacción de la membrana con el citoesqueleto de la espina y con ello colapsarla ⁷¹.

Receptores para los neurotransmisores

Como se mencionó anteriormente, una fracción de la población de todas las subunidades de los receptores glutamatérgicos ha sido encontrada en los microdominios de membrana. Los receptores AMPA tienen dos palmitoilaciones en la región transmembranal y una en la región carboxilo terminal. Hasta el momento no se sabe si estas palmitoilaciones le permiten asociarse con los microdominios. Sin embargo el receptor NMDA que no tiene acilaciones es posible que puedan asociarse a los microdominios gracias a su unión a PSD-95 o PSD-93. Estas proteínas de andamiaje de la familia MAGUK tienen palmitoilaciones que les permiten acoplarse a los microdominios, mientras que SAP-97 y SAP-102 otras proteínas de la familia de MAGUK que no tienen palmitoilación y no muestran afinidad por los microdominios ^{99, 100}. Esto sugiere que existen dos poblaciones de receptores, una se localiza afuera de los microdominios acoplada a SAP-97 o SAP-102, y otra está acoplada a PSD-95 o 93 dentro de los microdominios.

Los receptores para otros neurotransmisores también han sido localizados en los microdominios. Los receptores GABA_A también se ha encontrado asociado a los microdominios junto con la ATPasa Na⁺/K⁺ ¹⁰¹. En las células colinérgicas como las neuronas filiales se ha visto que la subunidad $\alpha 7$ de los receptores nicotínicos ($\alpha 7$ nAChR) se asocian con los microdominios, de esta asociación depende la formación de los agregados de las espinas somáticas. Cuando estas neuronas son

tratadas con un quelante de colesterol los agregados se dispersan en pequeños cúmulos ¹⁰².

Los receptores NMDA y los microdominios de membrana.

Como ya se mencionó se ha reportado que el receptor NMDA se asocia con los microdominios lipídicos así como las cinasas que lo fosforilan como Src y Fyn ⁶⁷, ⁷⁰. También hay evidencia de que los receptores NMDA y su fosforilación se regulan por su asociación con estos microdominios. La inducción de isquemia incrementa la fosforilación de las subunidades NR2A y NR2B principalmente en los microdominios, lo cual se correlaciona con una disminución de la concentración del receptor NMDA en esta fracción y un aumento en la densidad postsináptica ⁶⁷. Por otra parte, un estudio en donde retiran colesterol de la membrana utilizando β -metilciclodextrina (β MC) reporta que este tratamiento incrementa la sobrevivencia de neuronas corticales en cultivo expuestas al agonista NMDA y a la privación de glucosa/oxígeno sin afectar la corriente de Ca^{2+} del receptor o el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ⁵⁹. Esta evidencia indica que la funcionalidad del receptor NMDA cambia cuando se localiza en los microdominios de membrana lo cual podría deberse a que el calcio que entra por el canal del receptor va a interactuar con distinto número o clase de moléculas que cuando está fuera de ellos.

Hasta el momento no existen reportes del reclutamiento de receptores NMDA hacia los microdominios lipídicos en respuesta a estímulos, sin embargo la evidencia indica que es importante la asociación del receptor con los microdominios para la eficiente señalización mediada por la entrada de calcio a través del receptor NMDA. Esta entrada de calcio es uno de los eventos más importante para la

inducción de plasticidad sináptica incluyendo la formación de la memoria por lo cual el reclutamiento de receptores a los microdominios podría ser uno de los mecanismos que regulan al receptor NMDA durante el aprendizaje.

Los receptores NMDA y la memoria espacial.

Los mecanismos que ocurren en procesos de plasticidad sináptica han sido estudiados ampliamente durante el aprendizaje de tareas espaciales como el laberinto acuático de Morris. En esta tarea un animal aprende a localizar una plataforma sumergida en un tanque de agua guiándose mediante claves espaciales visuales. Las memorias espaciales como el aprendizaje en el laberinto acuático de Morris son declarativas¹⁰³⁻¹⁰⁵. La cual se forma inicialmente como memoria de corto plazo y perdura solo algunas horas. Con el entrenamiento suficiente, la memoria se consolida mediante un proceso que toma de 3 a 6 horas en el cual ocurren cambios en la síntesis de proteínas, de esta forma se establece la memoria de largo plazo que perdura por varios días¹⁰⁶. Cuantiosos estudios, algunos de los cuales se citan a continuación, demuestran que el receptor NMDA está involucrado en la formación de la memoria de corto plazo así como en la cascada de señalización que lleva a un cambio en la síntesis de proteínas para la consolidación de este tipo de memoria espacial.

La contribución del receptor NMDA en plasticidad sináptica y especialmente en memoria espacial ha sido estudiada ampliamente en el hipocampo. Se sabe que la inyección intraventricular o directamente en el hipocampo de un antagonista del receptor NMDA afecta el desempeño en tareas como el laberinto acuático de Morris de igual forma que afecta la inducción de LTP¹⁰⁷. Estudios con manipulaciones genéticas también han demostrado la intervención del receptor NMDA en el aprendizaje espacial pues el aumento en la expresión de la subunidad NR2B

mejora el desempeño las tareas espaciales ¹⁰⁸. Además se ha visto que las diferencias individuales en el desempeño durante el aprendizaje espacial correlacionan con la expresión en membrana de NR1 en la región CA3 del hipocampo ¹⁰⁹. Sin embargo, en regiones corticales se ha estudiado en menor medida la contribución del receptor NMDA en plasticidad a pesar de que existen estudios donde se muestra su intervención. Estudios de nuestro laboratorio demostraron que la inyección de AP5 en la corteza insular (CI) afecta la adquisición del aprendizaje de la tarea en el laberinto acuático ¹¹⁰. La CI es una región en la corteza temporal que se sabe que está involucrada en reacciones viscerales y estrés, tiene conexiones con estructuras límbicas incluyendo la amígdala, los núcleos mediodorsales del tálamo y la corteza prefrontal ¹¹¹. También se ha relacionado con el aprendizaje y memoria en diferentes tareas aversivas como prevención pasiva y condicionamiento aversivo a los sabores ^{112, 113}. Se ha reportado que la estimulación de alta frecuencia *in vivo* en el núcleo basolateral de la amígdala induce LTP en la CI, lo cual fue bloqueado por la aplicación de antagonistas (CPP, MK801 y AP-5) del receptor NMDA ^{113, 114}.

Como indica toda esta evidencia, la importancia del receptor NMDA en el aprendizaje espacial es bastante clara, sin embargo existen muy pocos estudios de cómo se regula el receptor NMDA durante este aprendizaje. En regiones corticales no existe ningún estudio al respecto, en hipocampo, solo se sabe que el entrenamiento en una tarea espacial (laberinto radial) induce el incremento en la fosforilación total de la subunidad NR2B después de 4 días de entrenamiento ¹¹⁵. Sin embargo, durante la formación de la memoria, no existen estudios sobre otros mecanismos de regulación del receptor, como su reclutamiento a microdominios lipídicos.

Planteamiento del problema

Se sabe que el receptor NMDA es un elemento importante en la inducción de la plasticidad sináptica como es la formación de la memoria. La regulación del receptor NMDA puede darse mediante diversos mecanismos, tales como fosforilación, cambios en la proporción de las subunidades o en la cantidad y distribución de receptores en sinapsis. Sin embargo se desconoce cuáles son los mecanismos que intervienen en la formación de la memoria. El aprendizaje espacial ha sido extensamente estudiado en el hipocampo, no obstante, se ha demostrado recientemente que la CI también interviene en la formación de este tipo de memoria, sin embargo no existen estudios acerca de la regulación el receptor NMDA.

Recientemente se ha generado evidencia de que la asociación del receptor con microdominios lipídicos de la membrana es un mecanismo importante en la regulación del receptor NMDA. Esta evidencia sugiere que la asociación del receptor con los microdominios cambia la funcionalidad del receptor. Puesto que la plasticidad sináptica es el cambio en la eficiencia con la cual se comunican las neuronas, el reclutamiento de receptores en los microdominios lipídicos podría ser un mecanismo para ello. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado el papel de los microdominios lipídicos durante procesos de plasticidad, a pesar de que se ha demostrado su importancia en la traducción de señales en respuesta a estímulos como son los factores de crecimiento en el sistema nervioso. Por lo tanto, el estudio de la translocación del receptor NMDA durante el aprendizaje espacial sería la primera aproximación para conocer la contribución de los microdominios lipídicos en procesos de plasticidad sináptica.

Hipótesis

Durante la formación de la memoria espacial el receptor NMDA puede modularse por fosforilación, por cambios en la proporción de las subunidades, por inserción de receptores a la membrana sináptica, o por el reclutamiento de receptores NMDA hacia microdominios lipídicos, el cual podría ser un nuevo componente en la regulación funcional del receptor durante la plasticidad sináptica.

Objetivo General

Determinar en hipocampo y en CI si el aprendizaje de una tarea espacial induce cambios en la expresión de las subunidades, fosforilación, inserción de receptores a la sinapsis y/o el reclutamiento de receptores en microdominios lipídicos. Estudiar los mecanismos que le permite al receptor NMDA asociarse a los microdominios de membrana.

Objetivo específicos

- **Analizar la fosforilación de las subunidades NR2A Y NR2B inmediatamente después del aprendizaje de la tarea espacial del laberinto acuático de Morris.**
- **Estudiar si existe reclutamiento de receptores NMDA hacia los microdominios lipídicos durante el entrenamiento en el laberinto acuático de Morris en la CI y el hipocampo**
- **Determinar si durante el aprendizaje espacial existe un aumento en la concentración de receptores NMDA en sinaptosomas lo cual reflejaría un aumento en la inserción de receptores en la sinapsis.**

- **Determinar si el reclutamiento del receptor NMDA en regiones sinápticas se correlaciona con el decremento de la población de receptores que se asocia con la densidad postsináptica.**
- **Estudiar si las proteínas de la familia MAGUK están involucradas en la asociación del receptor con los microdominios lipídicos.**
- **Estudiar la contribución del dominio carboxilo terminal de las subunidades NR2 en su asociación con los microdominios lipídicos.**

Métodos

Entrenamiento

El entrenamiento se realizó en un laberinto acuático que consiste de un tanque circular de 1.5 m de diámetro y 1.0 m de alta, con fondo y paredes negras, con una plataforma transparente localizada en una posición fija y sumergido 1 cm. Este tanque está localizado en un cuarto iluminado con poca luz y rodeado por varias claves espaciales. El entrenamiento consiste de 10 ensayos. En cada ensayo el animal se introduce en el tanque en una de 10 posiciones preestablecidas azarosamente, se le permite nadar por un máximo de 60 s hasta que localice la plataforma, donde permanece por 30s. Si el animal no encuentra la plataforma en el límite de tiempo se le conduce hacia ella con la mano. Después de los 30 s en la plataforma, el animal descansa por 30s en una caja fuera del laberinto, antes del siguiente ensayo. Se mide en cada ensayo el tiempo en que la rata llega a la plataforma (latencia) mediante un sistema computarizado (Chromotrack 3, San Diego Instruments). Además de las ratas entrenadas se utiliza un grupo de ratas controles de nado, estas ratas fueron introducidas en 10

ocasiones al laberinto acuático sin la plataforma, en donde permanecieron en cada ensayo el mismo tiempo promedio que las ratas entrenadas. 24 horas después del entrenamiento se realizó la prueba, en la cual la rata nada durante 2 minutos en el laberinto acuático sin la plataforma. Se contaron las veces que la rata cruza por el sitio en donde se encontraba la plataforma el día del entrenamiento.

Aislamiento de los microdominios lipídicos

Se utilizó el método convencional basado en un gradiente de densidad ⁶³. Muestras de CI y de ratas sacrificadas inmediatamente después de la primera sesión de entrenamiento fueron homogenizadas en buffer de lisis para aislar microdominios (Tritón-X100 1%, NaCl 150mM, 25mM Tris-HCl pH 7.5, tableta de inhibidores de proteasas (Roche), 50mM NaF, 10mM NaP₂O₇, 1mM Ortovanadato de Na). 2 mg de proteínas de los homogenizados de corteza insular y 3.5 mg de homogenizado de hipocampo fueron centrifugados a 1500 x g por 10 min para retirar núcleos y restos celulares. En los experimentos con ratones se utilizó 3.5 mg de proteína de homogenizado de toda la corteza del ratón, pero se disminuyó a 0.5% la concentración de Tritón. El sobrenadante fue centrifugado a 15000 x g por 15 min para aislar complejos insolubles en Tritón. El precipitado (fracción insoluble) fue resuspendido en 0.5ml buffer del lisis para aislar microdominios y se mezcló con 1ml de sacarosa 2M, en buffer de gradientes (NaCl 150mM, 25mM Tris-HCl pH 7.5, tableta de inhibidores de proteasas). Esta mezcla fue colocada en el fondo de tubos (Ultra-Clear, Beckman) de 5ml y fue cubierta por 2ml de sacarosa 1M y 1.5M de sacarosa 0.2M. El gradiente fue centrifugado a 200000 x g por 18h en un rotor SW 65 TI. Todo el procedimiento se realizó a 4°C. Se colectaron 5 fracciones de 1 ml de la parte superior hasta el fondo del tubo. En los experimentos en los cuales se

utilizaron ratones el precipitado fue resuspendido en buffer de gradientes sin sacarosa. 15 μ l de cada fracción se corrieron en un gel de poliacrilamida de 7.5% y se realizaron los inmunoblots.

Aislamiento de sinaptosomas, microdominios sinápticos y densidad postsináptica.

El aislamiento de sinaptosomas, microdominios sinápticos y densidad postsináptica se realizó basándose en el protocolo descrito por Besshoh en 2005⁶⁷. Este protocolo se basa a su vez en las técnicas más utilizadas para aislar las densidades postsinápticas^{116, 117}. Se describe a continuación: muestras de CI de ratas sacrificadas inmediatamente después de la primera sesión de entrenamiento fueron lisadas con un homogenizador de teflón y vidrio, en 1ml de buffer A (0.32 M sacarosa, 0.5 mM CaCl_2 , 1 mM NaHCO_3 , 1 mM MgCl_2 , 1mM NaF, 2 mM ortovanadato de sodio, 20 mM beta-glicerofosfato, tableta de inhibidores de proteasas de Roche). El homogenizado fue centrifugado a 1000 x g por 10 minutos, El precipitado fue resuspendido en 0.5 ml de solución A y centrifugado a 1000 x g por 10 minutos, los sobrenadantes de estas dos centrifugaciones se mezclaron y se centrifugaron a 15000 x g por 15 minutos, el precipitado fue resuspendido en 1 ml de solución B (los mismos componentes del buffer A pero sin CaCl_2 y sin MgCl_2). Este homogenizado se colocó sobre un gradiente de densidad de sacarosa compuesto por 1.3ml de sacarosa 1.2M, 1M y 0.85M. El gradiente se centrifugó a 82500 x g por 2 horas. La banda que está en la interfase entre 1M y 2M de sacarosa corresponde a la fracción sinaptosomal, la cual fue recuperada y se diluyó en 1 volumen de solución B y 2 de solución C (los mismos componentes de la solución B pero sin sacarosa, y NaHCO_3). Se centrifugó la muestra a 100000x g por

1 hora para precipitar los sinaptosomas y se resuspendió en 1.5ml de sacarosa 40% en solución B con Tritón 1%, después de una incubación de 30 minutos la muestra se colocó en la parte inferior de un gradiente con 2.5ml de sacarosa 35% y 1ml de sacarosa 6%. Se centrifugó durante 18 horas a 200000 x g. Todo el procedimiento se realizó a 4°C. Se colectaron 10 fracciones de 0.5ml de la parte superior hasta el fondo del tubo. El precipitado, que corresponde a la densidad postsináptica (PSD) que no contiene microdominios, fue resuspendió en buffer C. Volúmenes iguales de cada fracción se corrieron en un gel de poliacrilamida de 7.5% y se realizaron los Western blots.

Inmunoprecipitación

Las muestras fueron homogenizadas en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P40 1% o Tritón 1%, Ortovanadato de Sodio 10 mM, NaF 25 mM, inhibidores de proteasas Roche, pH 7.5). Todos los procedimientos se realizaron a 4°C. Se centrifugó a 1500 x g por 5 minutos para retirar núcleos y restos celulares grandes. Se estimó la concentración de proteínas mediante ensayo de Lowry. (Bio-Rad Dc Protein Assay). Las subunidades NR2A o NR2B se inmunoprecipitaron a partir de 2 a 3 mg de proteína con 12µl de anticuerpo monoclonal específico para NR2A o NR2B (1:500 Santa Cruz Biotechnology) en 0.5ml de buffer de lisis, se incubó toda la noche posteriormente se agregó 30µl de proteína G-agarosa (Roche), y se incubó a 4°C en agitación constante durante 2 horas, después se centrifugó por 2 minutos a 1500 x g. El precipitado se lavó 2 veces con 300 µl de buffer de lisis, 2 veces más con buffer de alta concentración de sales (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P40 0.1% o Tritón 0.1%, pH 7.5) y para retirar las sales se realizó un lavado con Tris-HCl 50 mM pH 7.5, Nonidet P40

0.1% o Tritón 0.1%. Las centrifugaciones entre cada lavado se realizaron a 1500 x g. Después de estos lavados se centrifugó a 5000 x g durante 3 minutos, se retiró el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 20 μ l de buffer Laemmli con 10% de β -mercapto-etanol. Se hirvieron las muestras durante 5 minutos y se centrifugó a temperatura ambiente a 2000 x g durante 3 min. Las muestras fueron probadas en un Western Blot.

Western Blot

20 μ g de proteína de lisado de hipocampo al igual que las muestras de los gradientes y de la inmunoprecipitación fueron mezcladas con buffer Laemmli 1:1 y hervidas durante 5 minutos. Posteriormente fueron cargadas en un gel 7.5% SDS-poliacrilamida. La electroforesis se llevó a cabo a 110V durante una hora y media. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (BioRad) a 25 V por 50 minutos. El buffer de transferencia estuvo compuesto de 25mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS y 20% (vol/vol) de metanol. La membrana resultante de la transferencia se incubó toda la noche en buffer TBS-T (Tris 10mM, NaCl 0.9%, Tween 20 0.1% pH 7.5) con 5% de BSA. Para detectar las subunidades del receptor NMDA, las membranas de PVDF fueron incubadas 24 horas a 4°C con: anticuerpo anti NR2A y anti NR2B policlonales hechos en cabra (1:500; Santa Cruz Biotech.); Anti NR2B fosfotirosina 1472 hecho en conejo (1:1000; Sigma); Anti fosfotirosinas monoclonal hecho en ratón (1:500; Sigma).

Las membranas se lavaron durante 5 minutos 4 veces en TBS-T, y se incubaron por una hora con anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano (Anti ratón hecho en cabra IgG Zimed; Anti cabra hecho en burro IgG Sigma; Anti conejo hecho en ratón IgG Sigma). Las membranas se lavaron 4 veces por 5 minutos con TBS-T y 2 veces con TBS. Después la membrana se incubó con sustrato

quimioluminiscente HRP (Immobilon™Wester, Millipore) y se expuso en placas radiográficas. La inmunoreactividad se cuantificó densitométricamente con el software ImageJ 1.31V, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA. Los controles negativos se hicieron sin agregar los anticuerpos primarios.

A las membranas que se les quitó el anticuerpo para posteriormente incubarla contra otro anticuerpo, se lavaron 2 veces durante 20 minutos a 37°C en buffer de elución Tris 62.5 mM, 2% SDS, β-mercaptoetanol 100 mM), se lavaron 5 veces con TBS-T, se bloquean con BSA 5% durante media hora y se incubó con el anticuerpo correspondiente.

Resultados

Curva de aprendizaje en el laberinto acuático de Morris.

Las ratas fueron entrenadas durante 10 ensayos en el laberinto acuático y se midió el tiempo que tardan en llegar a la plataforma de escape en cada ensayo (latencia). Las ratas control nadaron en el laberinto acuático sin la plataforma el mismo tiempo promedio que las entrenadas. Como se puede observar en la figura 3, la latencia disminuye en cada ensayo, lo cual refleja el aprendizaje de esta tarea. 24 horas después del entrenamiento se realizó la prueba de memoria, en la cual la rata nada durante 2 minutos en el laberinto acuático sin la plataforma. Se contaron las veces que la rata cruza por el sitio en donde se encontraba la plataforma el día del entrenamiento. Diez ensayos son suficientes para que esta memoria se consolide como una memoria de largo plazo medida 24 horas después del entrenamiento ya que las ratas entrenadas cruzaron mayor cantidad de veces que los controles de nado el sitio donde se encontraba la plataforma durante el entrenamiento (Figura 3).

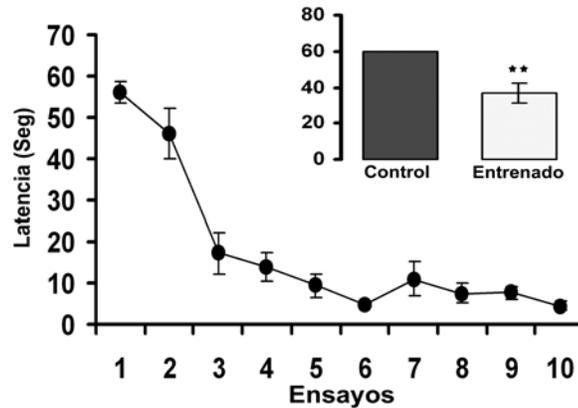


Figura 3. Curva de aprendizaje. La gráfica muestra la latencia promedio (\pm error estándar) para encontrar la plataforma durante el aprendizaje en el laberinto acuático de Morris ($n = 9$). El grupo control nadó el mismo tiempo promedio que las ratas entrenadas en cada ensayo. La gráfica interior muestra la latencia (\pm error estándar) de las ratas entrenadas y las controles ($n = 5$) durante una prueba 24 horas después del entrenamiento.

El entrenamiento espacial incrementó la fosforilación en tirosinas de la subunidad NR2B

Con el fin de determinar si la fosforilación de la subunidad NR2B del receptor NMDA cambia con el entrenamiento, se analizó la fosforilación total en tirosina de la subunidad NR2B mediante la inmunoprecipitación de la subunidad e inmunoblot contra proteínas fosforiladas en residuos de tirosina. Como se muestra en la figura 4, no se logró detectar cambios en la fosforilación de la subunidad NR2B entre las muestras de ratas entrenadas y controles de nado después de una sesión de 10 ensayos en el laberinto acuático.

En otra tarea espacial (laberinto radial) se ha reportado incremento en la fosforilación en tirosinas a partir de tejido del hipocampo obtenido después de un mayor número de sesiones de entrenamiento (4 a 8 sesiones), por lo que analizamos la fosforilación del receptor después de 5 sesiones de entrenamiento en

el laberinto acuático. El inmunoblot mostró que el entrenamiento durante 5 sesiones induce un aumento en la fosforilación en tirosinas en el inmunoprecipitado de la subunidad NR2B en el hipocampo y no en la CI, lo cual concuerda con lo reportado usando el laberinto radial ya que una sola sesión de entrenamiento en esta tarea tampoco incrementó de manera detectable la fosforilación mientras que 4 sesiones si la incrementaron ¹¹⁵.

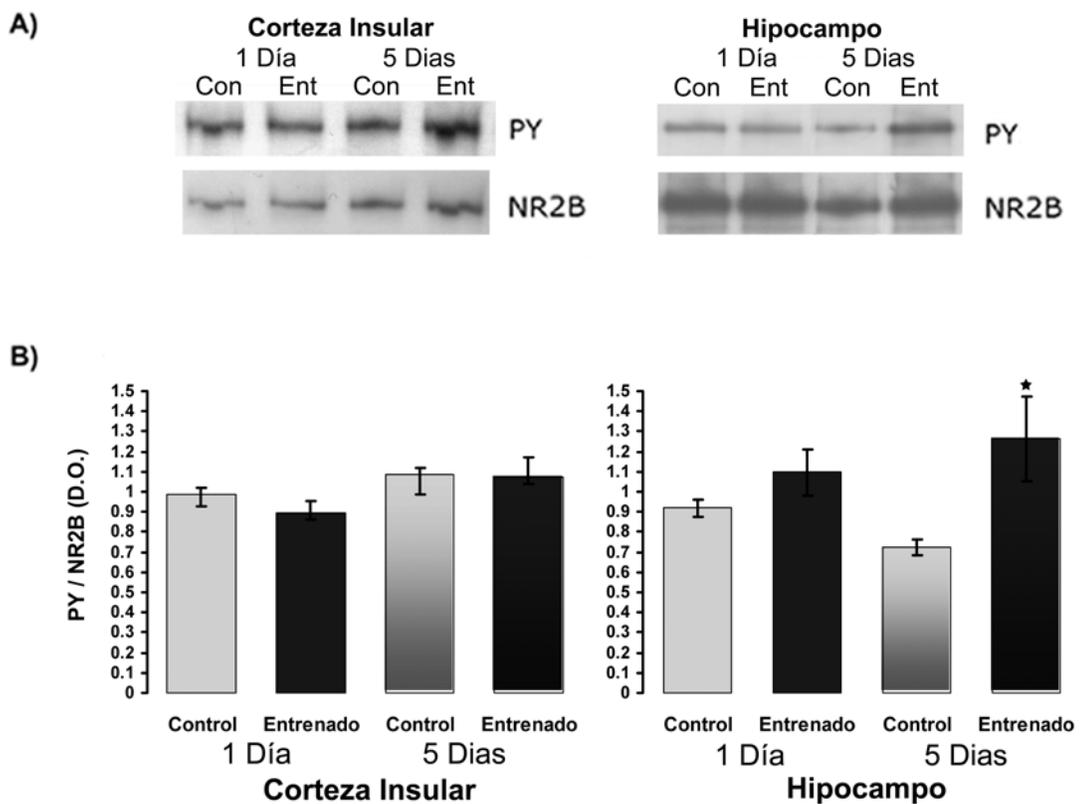


Figura 4. Fosforilación de las tirosina de la subunidad NR2B. A) La subunidad NR2B fue inmunoprecipitada a partir de lisado de CI o hipocampo de ratas entrenadas y controles de nado (1 animal por muestra), se realizó inmunoblot contra las tirosinas fosforiladas (PY) y contra la subunidad NR2B. B) La densidad óptica de las bandas fue cuantificada. Los resultados se muestran como la densidad óptica de la banda correspondiente a la fosforilación entre el total de la subunidad NR2B (promedio \pm error estándar), $n=8$, $*p < 0.05$.

Se realizaron varios controles de la especificidad de la detección de la fosforilación de la subunidad NR2B. La aplicación del procedimiento de inmunoprecipitación sin anticuerpo o la inmunoprecipitación un anticuerpo que reconoce una proteína diferente (GLUR1) a la subunidad NR2B no produce ninguna señal en el inmunoblot contra proteínas fosforiladas en tirosinas o contra las subunidades del receptor NMDA (Figura 5). El inmunoblot en ausencia de anticuerpo primario tampoco originó ninguna banda detectable. El análisis de la fosforilación total en tirosinas mediante inmunoprecipitación de la subunidad NR2B detecta la fosforilación total de todos los residuos forforilables de la subunidad NR2B. Sin embargo, el anticuerpo antifosfotirosinas también reconoce las tirosinas fosforiladas de las subunidades NR2A que co-precipitan con el NR2B, ya que el inmunoblot de la subunidad NR2B mostró que una cantidad apreciable de receptor NR2A co-precipita con el receptor NR2B (Figura 5).

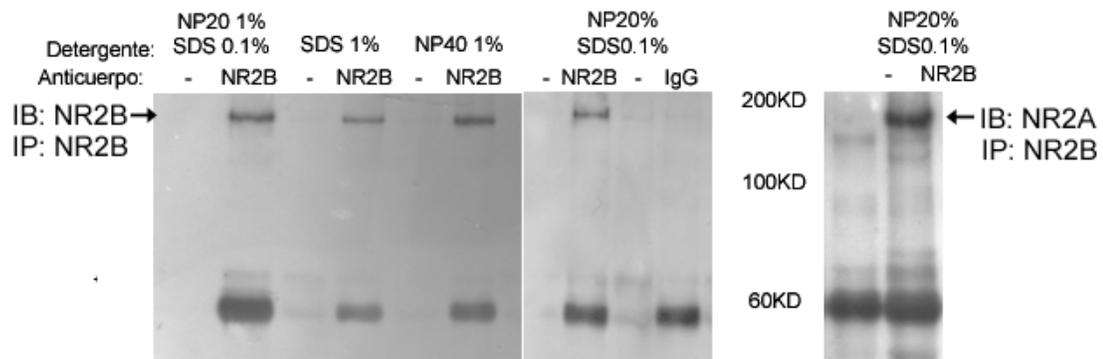


Figura 5. Controles de inmunoprecipitación. Se realizó la inmunoprecipitación (IP) contra la subunidad NR2B con diferentes detergentes, sin anticuerpo o con una inmunoglobulina que no reconoce NR2B. A partir del inmunoprecipitado, se realizó inmunoblot (IB) contra NR2B o NR2A como se indica.

Debido a que ambas subunidades NR2 tienen el mismo peso molecular no es posible diferenciar entre todos los residuos fosforilados de la subunidad NR2B y los de la subunidad NR2A, así que la figura 4 muestra la fosforilación total de las tirosinas de la subunidad NR2B sumada a la fosforilación en tirosinas de la subunidad NR2A que co-precipitó con NR2B. Los cambios moderados en uno de los residuos de cualquiera de las subunidades posiblemente no puedan ser detectados mediante esta técnica. Por esta razón se analizó la fosforilación específica del residuo 1472 de la subunidad NR2B el cual ha sido implicado en procesos de plasticidad sináptica. Para ello se realizó la inmunoprecipitación del receptor NR2B y se analizó por Western blot la fosforilación del residuo 1472 de la subunidad NR2B mediante el uso de un anticuerpo que reconoce específicamente a este residuo fosforilado. Como se puede ver en la figura 6, una sola sesión de entrenamiento induce un incremento de aproximadamente 30% en la fosforilación de la tirosina 1472 de la subunidad NR2B en la CI pero no en el hipocampo. Los controles realizados muestran que esta fosforilación es específica del receptor NR2B ya que la inmunoprecipitación sin anticuerpo o el inmunoblot sin anticuerpo primario no produjeron ninguna señal detectable (Figura 6C). No se realizaron más controles acerca de la especificidad del anticuerpo para reconocer el residuo 1472 fosforilado, sin embargo el uso de este anticuerpo con este propósito ha sido ampliamente reportado.

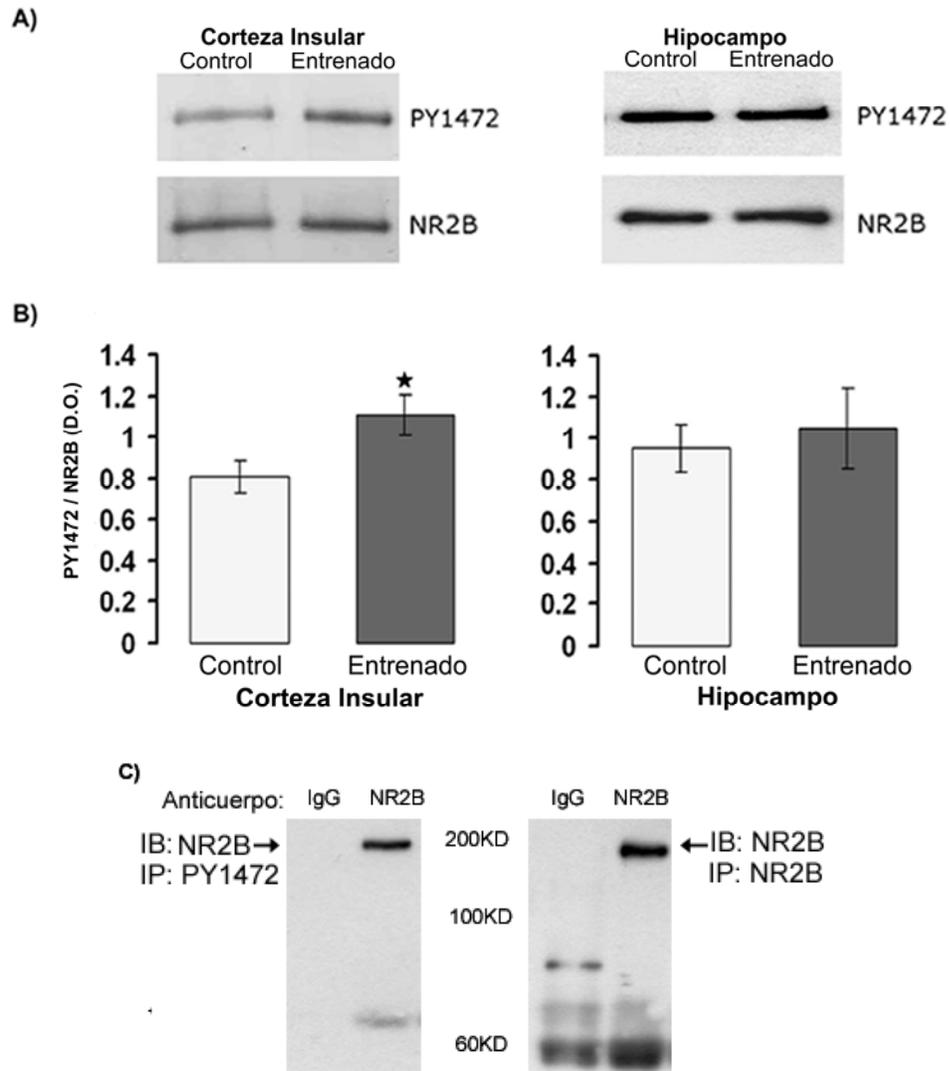


Figura 6. Efecto del entrenamiento sobre la fosforilación de la Y1472 de NR2B (PY1472).

A) La subunidad NR2B fue precipitada a partir de lisado de CI o hipocampo de ratas entrenadas y controles de nado (1 animal por muestra), se realizó inmunoblot contra la PY1472 y NR2B. B) Los resultados de la cuantificación de la densidad óptica de las bandas se muestran como fosforilación entre el total de la subunidad NR2B (promedio \pm error estándar). CI n=9, hipocampo n=12, *p < 0.05. C) Controles de inmunoprecipitación. Se realizó la inmunoprecipitación con la IgG que reconoce a la subunidad NR2B y con una IgG que no lo reconoce, se realizó inmunoblot contra PY1472 y contra NR2B.

En entrenamiento incrementó la concentración de los receptores NMDA en los microdominios lipídicos

Para determinar si el entrenamiento en el laberinto acuático induce el reclutamiento de receptores NMDA en microdominios lipídicos se estandarizó un método ya reportado para aislar microdominios lipídicos mediante un gradiente de sacarosa a partir de la fracción insoluble de tejido cerebral. Se colectaron 5 fracciones de 1ml de la parte superior a la parte inferior del gradiente. Como se muestra en la figura 7, en las fracciones ligeras del gradiente se puede detectar a las subunidad NR2B de los receptores NMDA en la fracción 2, mientras que en el resto de las fracciones solo se detecta en la 5. En la fracción 2 también se concentran marcadores de microdominios lipídicos como la flotillina-1, el gangliósido GM1 y el colesterol mientras que en las otras fracciones no existe una cantidad detectable de estas moléculas. También se observa que la distribución de proteínas en el gradiente, cuantificadas mediante el método de Bradford, concuerda con lo reportado ⁷¹ (Figura 7).

Una vez estandarizado el método, se aislaron microdominios lipídicos a partir de muestras de CI de ratas entrenadas por un día y controles de nado. Se analizó la concentración de las subunidades NR1, NR2A y NR2B en el mismo volumen de muestra mediante inmunoblot específico para cada proteína. Se analizó la fracción enriquecida en microdominios lipídicos (2) y la fracción 5, en donde se reporta se localiza citoesqueleto, densidad postsináptica y otros complejos insolubles con alta densidad ⁶³. Sin embargo la mayor parte de la densidad postsináptica permanece en el precipitado como se mostrará posteriormente. Las muestras de ratas entrenadas tuvieron un incremento de la concentración de NR2B y NR2A en la fracción ligera 2 comparadas con los controles de nado, mientras que no se detecta

un cambio en las fracciones densa. Por lo tanto esto sugirió que el entrenamiento indujo la translocación del receptor NMDA a microdominios lipídicos de membrana (Figura 8).

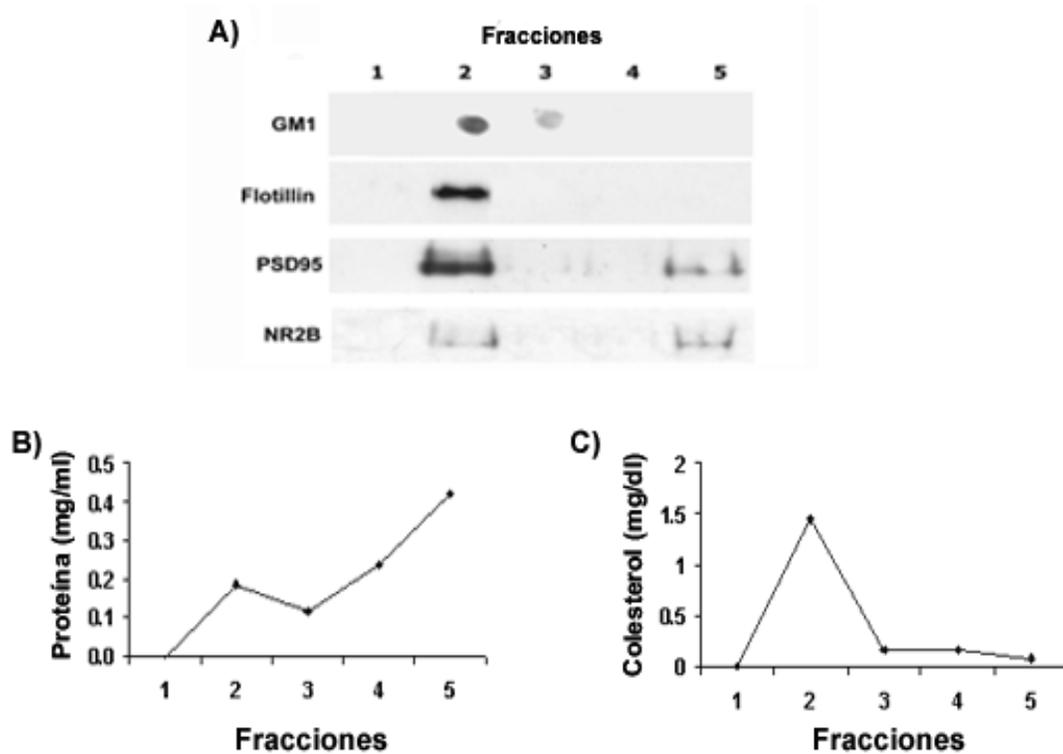


Figura 7. Aislamiento de los microdominios lipídicos a partir de extracto insoluble. Se aisló la fracción insoluble en Tritón x-100 y se separó en un gradiente de sacarosa. 5 fracciones fueron obtenidas e igual volumen de cada una fue analizado mediante Western blot para las proteínas indicadas y mediante dot blot con toxina de cólera la concentración de GM1(A). B) Mediante el método de Bradford se analizó la cantidad de proteínas en cada fracción. C) Se analizó la cantidad de colesterol mediante un ensayo colorimétrico basado en la oxidación del colesterol.

Debido a que las subunidades del receptor se detectaron únicamente en las fracciones 2 y 5 se realizó la cuantificación de la densidad óptica solo para estas

fracciones y se graficó la relación de la densidad óptica correspondiente a las ratas entrenadas entre la correspondiente a las ratas control (Figura 8).

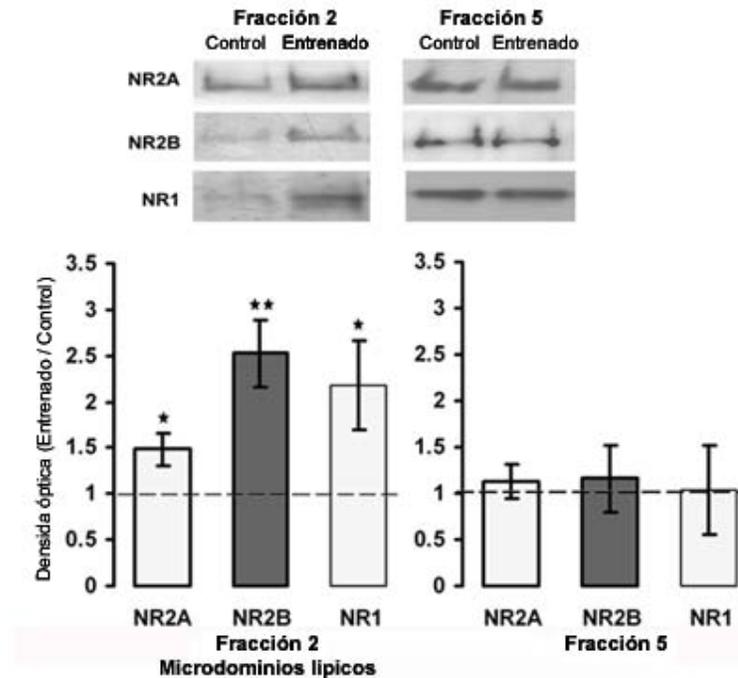


Figura 8. Efecto del entrenamiento en la concentración de receptor NMDA en microdominios de membrana. Se aislaron microdominios lipídicos a partir de las cortezas insulares (2 ratas por muestra) de ratas entrenadas y controles de nado. Volúmenes iguales de la fracción 1 y la fracción 5 fueron analizados mediante un inmunoblot contra las proteínas indicadas. Las gráficas muestran el análisis densitométrico de 5 experimentos independientes, los resultados se muestran como promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al control (densidad óptica del entrenado / control). ** $p < 0.01$, $p < 0.05$.

La concentración total los receptores NMDA en los sinaptosomas no cambió

Como se mencionó en la introducción, la inserción de receptores a la membrana sináptica provenientes de pozas intracelulares durante procesos de

plasticidad ya ha sido reportado con anterioridad. Así que el incremento en la concentración de receptores NMDA en los microdominios lipídicos podría deberse a un incremento en la inserción de receptores a la membrana sináptica y no a un desplazamiento lateral del receptor en la membrana hacia los microdominios lipídicos.

Para determinar si existe un incremento en la inserción de receptores a la membrana sináptica después de una sesión de entrenamiento en el laberinto acuático, se analizó la concentración de receptor NMDA y PSD-95 en sinaptosomas aislados a partir de muestras de CI. En la figura 9 se muestra alta concentración de subunidades NR2B en 10 fracciones del gradiente de sacarosa. Este método ha sido ampliamente reportado para aislar sinaptosomas, los cuales conservan la membrana postsináptica y la PSD ^{116, 117}. Las fracciones 6, 7 y 8 están enriquecidas en receptor NMDA lo cual concuerda con lo reportado ya que los sinaptosomas se localizan en la interfase entre 1 M y 0.2 M de sacarosa ¹¹⁶. También se puede observar que 3 μ g de la fracción sinaptosomal tiene una concentración de PSD-95 (considerado marcador de densidad postsináptica) un poco menor a 30 μ g de proteínas del lisado crudo, por lo cual se puede concluir que esta fracción efectivamente está enriquecida en membrana postsináptica y densidad postsináptica.

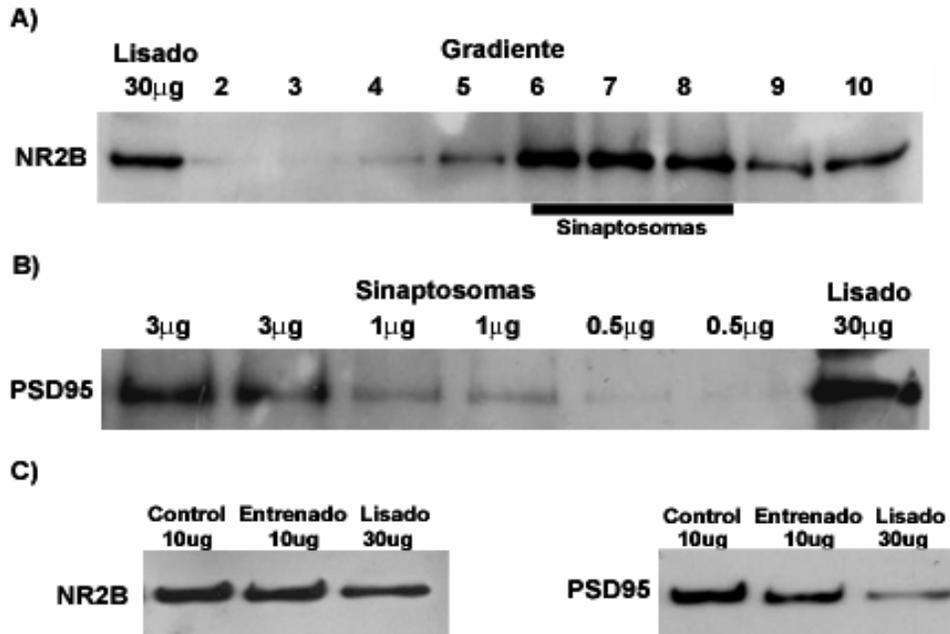


Figura 9. Aislamiento de sinaptosomas y PSD. Se realizó el gradiente de sacarosa para aislar sinaptosomas a partir de corteza. A) Se colectaron 10 fracciones del gradiente, el precipitado está incluido en la fracción 10. Se analizó mediante Western blot, la concentración de la subunidad NR2B en igual volumen de cada fracción (la fracción 1 no fue analizada) B) Se midió concentración de proteínas mediante el método do Lowry y se analizó mediante Western blot la concentración de PSD-95 en 0.5, 1, y 3 μ g de proteína de fracción sinaptosomal y 30 μ g de lisado crudo. C) Se aisló la densidad postsináptica mediante el método descrito por Besshoh (2005) a partir de los sinaptosomas y se analizó 10 μ g de este extracto y 30 μ g de lisado crudo mediante Western blot para detectar NR2B y PSD-95.

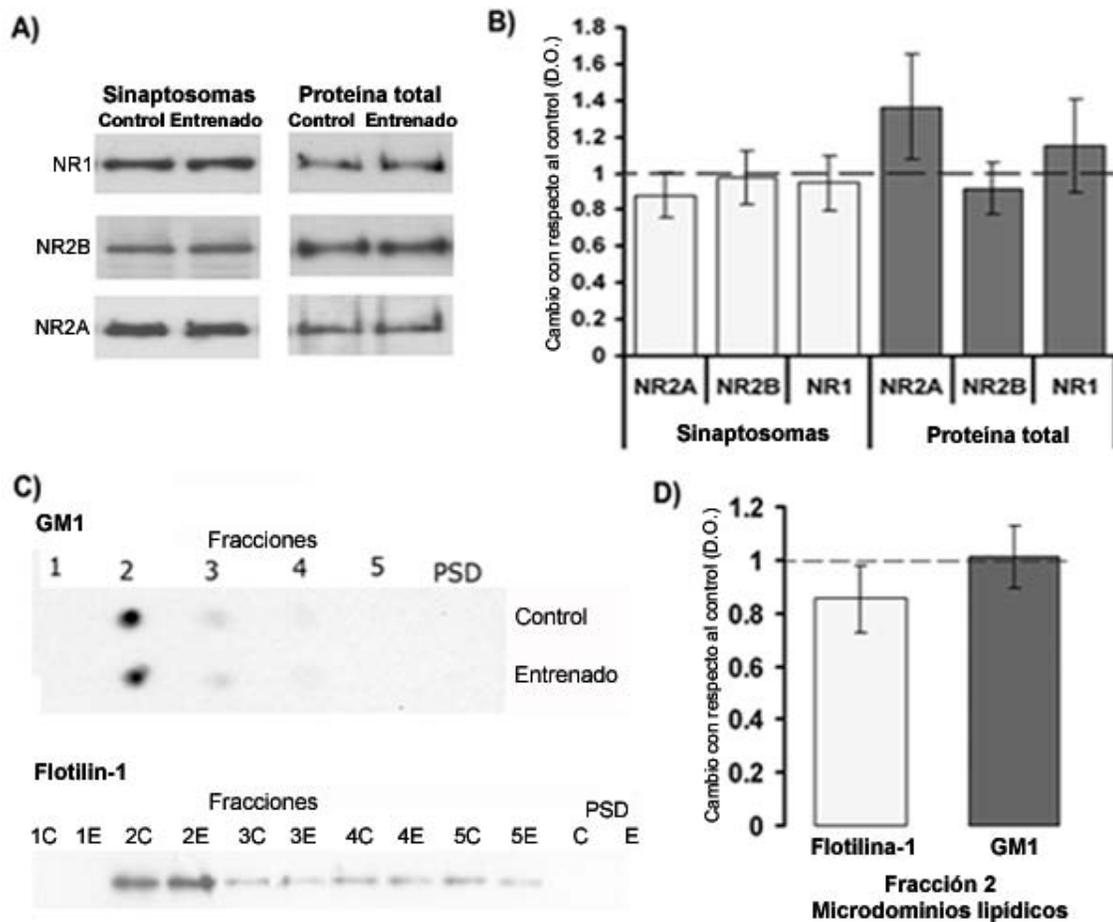


Figura 10. Efecto del entrenamiento en la concentración de receptor NMDA en los sinaptosomas y en la concentración de microdominios lipídicos. A) Análisis mediante Western blot de la concentración de receptor NMDA en 3 μ g de proteína de sinaptosomas (cortezas insulares de 3 ratas por muestra) y 10 μ g de lisado crudo (cortezas insulares de 1 rata por muestra) B) Análisis densitométrico de 4 experimentos independientes como el mostrado en A. C) Análisis de volúmenes iguales de las fracciones del gradiente de sacarosa para aislar los microdominios mediante Western blot para detectar flotilina-1 y dotblot para detectar GM1. D) Análisis densitométrico de 4 experimentos independientes como el mostrado en C. Los resultados se expresan como promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al control (densidad óptica del entrenado entre el control).

Posteriormente se analizó la concentración de receptor NMDA en los sinaptosomas de ratas sacrificadas inmediatamente después del entrenamiento en el laberinto acuático y controles de nado. Como se observa en la figura 10 no existen cambios significativos $p > 0.05$ en la concentración de receptor NMDA o PSD-95 en las fracciones sinaptosomales de ratas entrenadas comparadas con los controles de nado. También se analizó la concentración total de receptor NMDA en el homogenizado crudo de tejido de CI, el entrenamiento no induce un incremento en la síntesis de ninguna de las subunidades analizadas (Figura 10).

Estos resultados sugieren que el incremento en la concentración de receptor NMDA asociado a los microdominios no se debe al incremento en la síntesis de receptores o en la inserción de receptores en la membrana sináptica provenientes de pozas intracelulares.

Incremento de receptores NMDA y PSD-95 en los microdominios lipídicos y disminución en la PSD obtenida de sinaptosomas.

Los resultados anteriores mostraron que el entrenamiento no induce un incremento en la concentración de receptores NMDA en la fracción sinaptosomal, sin embargo se desconocía si el reclutamiento de receptores NMDA hacia los microdominios ocurre en membrana sináptica. Por lo cual se aislaron los microdominios a partir de fracciones sinaptosomales y se separó la densidad postsináptica que no está asociada a los microdominios mediante el mismo gradiente, utilizando un método ya reportado⁶⁷. Se extrajeron 10 ó 5 fracciones del gradiente de sacarosa, el precipitado fue resuspendido mediante sonicación en el mismo amortiguador del gradiente. Se analizó mediante Western blot un volumen

igual de cada fracción del gradiente de sacarosa y del precipitado. Como se muestra en la figura 11, cuando se extraen 10 fracciones, en las fracciones ligeras 3 y 4 se pueden detectar los marcadores de microdominios (Flotillita-1 y GM1), las subunidades del receptor NMDA y PSD-95. En la figura también se muestra que al incubar la fracción sinaptosomal 30 minutos con β -metil-ciclodextrina antes de la centrifugación las bandas correspondientes a PSD-95 y a las subunidades del receptor NMDA desaparecen. Esto es otra evidencia de que los receptores NMDA al igual que la PSD-95 de las fracciones ligeras se encontraban asociados a microdominios lipídicos.

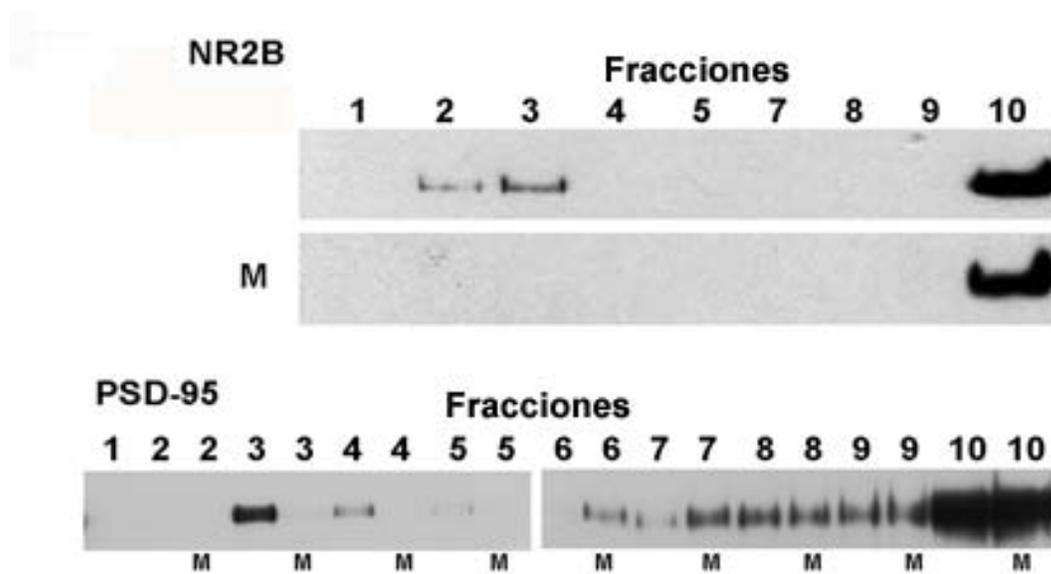


Figura 11. Distribución de la subunidad NR2B y de PSD-95 en el gradiente de sacarosa y efecto de la remoción de colesterol. Los sinaptosomas extraídos de la corteza fueron incubados con 50mM de metil- β -ciclodextrina (M) o sin el fármaco durante 30 minutos antes de la separación en el gradiente de sacarosa para aislar microdominios lipídicos. Se colectaron 10 fracciones del gradiente y el precipitado fue resuspendido en 1 ml del mismo amortiguador. Se analizó mediante Western blot volúmenes iguales de cada fracción.

Al aislar los microdominios y la densidad postsináptica a partir de la CI de ratas entrenadas y controles de nado se observa un aumento en la concentración de NR1, NR2A y NR2B en la fracción enriquecida en microdominios y una disminución en la densidad postsináptica (Figura 12). Lo cual sugiere que los receptores NMDA que se incorporan a los microdominios no provienen de pozas somáticas, sino que provienen de regiones membranales solubles.

Debido a que PSD-95 es una de las principales proteínas adaptadoras que se unen al receptor NMDA se analizó la concentración de PSD-95 en los sinaptosomas, en los microdominios lipídicos y en la densidad postsináptica (PSD). Como se puede ver en la figura 13, al igual que sucede con el receptor NMDA, PSD-95 se transloca a los microdominios lipídicos sinápticos y disminuye en la densidad postsináptica. No se observen cambios en el total de PSD-95 en los sinaptosomas. El aumento en la concentración de PSD-95 en los microdominios parece ser más grande que el aumento del receptor NMDA (Figura 13).

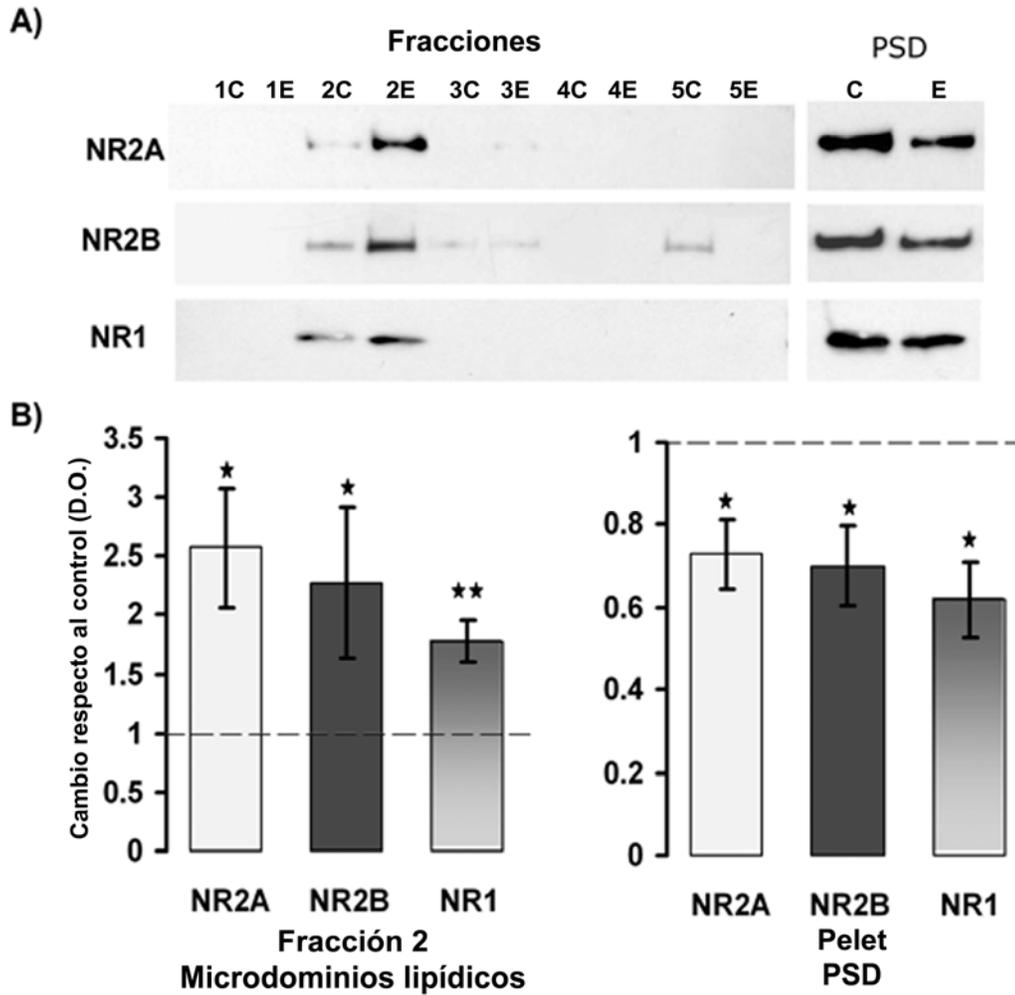


Figura 12. Efecto del entrenamiento en la concentración de receptor NMDA en los microdominios sinápticos. A) Análisis mediante Western blot del gradiente de sacarosa para aislar microdominios lipídicos y PSD a partir de sinaptosomas de ratas entrenadas y controles de nado (3 ratas por muestra), se analizaron volúmenes iguales de cada fracción. B) Análisis densitométrico de las fracciones 2 y 6 (6 experimentos independientes como el mostrado en A), los resultados se muestran como promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al control (densidad óptica del entrenado / control). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

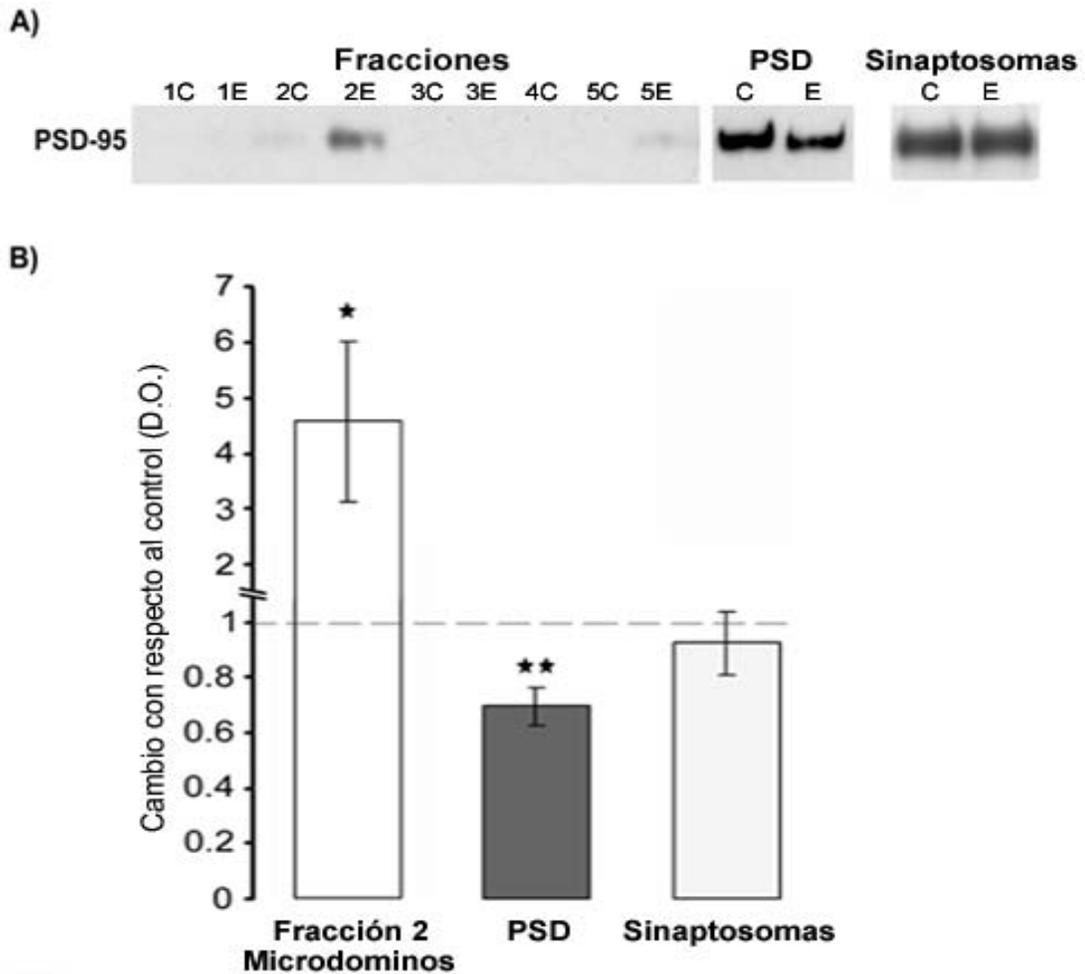


Figura 13. Efecto del entrenamiento en la concentración de PSD-95 en los microdominios sinápticos, PSD y sinaptosomas. A) Análisis mediante Western blot de la fracción sinaptosomal (3 μ g de proteína) y del gradiente de sacarosa par aislar microdominios lipídicos y PSD de ratas entrenadas y controles de nado (3 ratas por muestra), se analizaron volúmenes iguales de cada fracción. B) Análisis densitométrico de las fracciones 2, 6 y sinaptosomal (6 experimentos independientes como el mostrado en A), los resultados se muestran como promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al control (densidad óptica del entrenado / control). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

El entrenamiento espacial también indujo reclutamiento de receptores NMDA en el hipocampo.

Como ya se mencionó anteriormente, el aprendizaje espacial y principalmente la intervención del receptor NMDA ha sido ampliamente estudiada en el hipocampo, razón por la cual decidimos investigar si el reclutamiento de receptores NMDA a microdominios de membrana ocurre de la misma manera en esta estructura.

Se aislaron microdominios de membrana a partir de la fracción insoluble de homogenizado de la región dorsal del hipocampo. Se analizó un volumen igual de las fracciones 2 y 5 mediante Western blot. Al igual que ocurre en CI, en el hipocampo ocurre un incremento de la subunidades NR1 y NR2A en la fracción enriquecida en microdominios de membrana, mientras que no se detecta cambios en la fracción 5 (Figura 14A). Sin embargo, la concentración de la subunidad NR2B en ninguna de las fracciones cambia con el entrenamiento. Lo cual demuestra que durante el aprendizaje espacial existe una translocación de receptores NMDA en ambas estructuras, sin embargo la composición de subunidades del receptor es diferencial. En la CI se translocan receptores compuestos de subunidades NR1, NR2A y NR2B, mientras que en el hipocampo los receptores que son reclutados están compuestos solo por subunidades NR1 y NR2A.

Para analizar la especificidad de la translocación del receptor a los microdominios lipídicos con respecto a las regiones cerebrales se analizó la concentración de receptor NMDA en la corteza parietal una estructura donde no existen reportes de su participación el aprendizaje espacial. Como se esperaba, no existe un reclutamiento de este receptor en la corteza parietal, ya que no hay diferencias entre las ratas entrenadas y los controles de nado (Figura 14B).

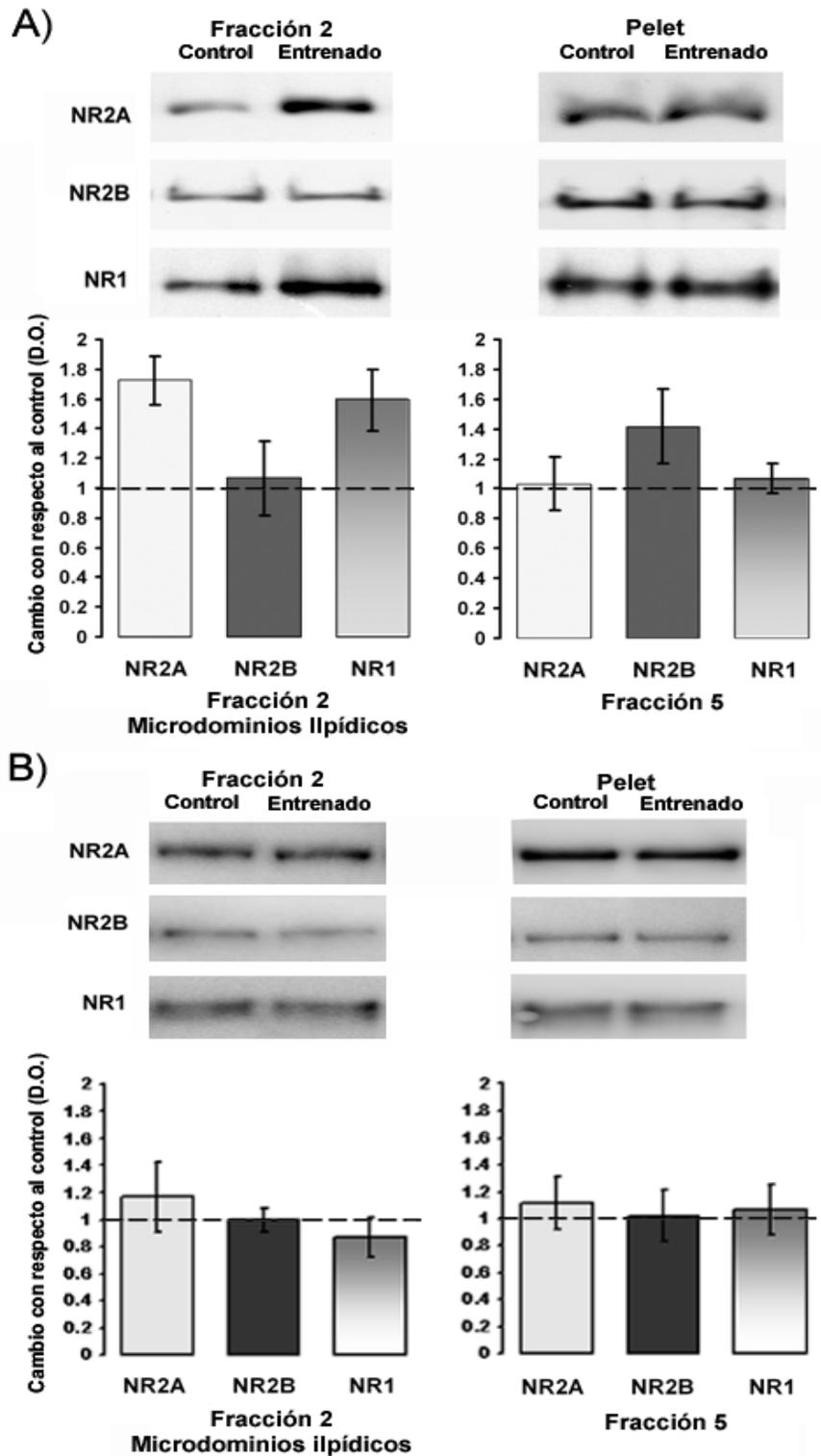


Figura 14. Efecto del entrenamiento en la asociación del receptor NMDA con los microdominios lipídicos en el hipocampo y en corteza parietal. Los microdominios de membrana fueron aislados a partir de fracción insoluble del hipocampo (A) y de corteza parietal (B) (1 y 2 animales por muestra)

respectivamente). En las gráficas se muestra el análisis mediante Western blot de las fracciones 2 y 5 para detectar las subunidades del receptor NMDA (5 (hipocampo) y 8 (parietal) experimentos independientes), los resultados se muestran como promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al control (densidad óptica del entrenado / control). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

La supresión génica de PSD-95 no redujo la asociación del receptor NMDA con los microdominios lipídicos

Con el objetivo de analizar la contribución de la proteína PSD-95 en la localización del receptor NMDA en los microdominios de membrana se aislaron los microdominios lipídicos a partir de la fracción insoluble obtenida de corteza de ratones silvestres y ratones mutantes a los cuales se les suprimió la expresión de la proteína PSD-95 ¹¹⁸.

Para este experimento a diferencia de los realizados en ratas se colectaron 5 fracciones del gradiente más el precipitado, el cual fue resuspendido por sonicación en 1ml de amortiguador en el cual se prepara el gradiente. Cuando el precipitado se aísla de la fracción 5, la mayor parte de receptores de glutamato y de PSD95 se localiza en el precipitado. La fracción 5 está mayormente enriquecida en proteínas de citoesqueleto como actina lo cual concuerda con lo reportado ⁶³. La concentración de PSD-95 y receptores NMDA en este precipitado es muy alta por lo que es posible considerarlo como una fracción enriquecida en densidad postsináptica, ya que frecuentemente las densidades postsinápticas se aíslan mediante precipitación como una fracción insoluble. La figura 15 también muestra que la proteína Src, que fosforila al receptor NMDA, se localiza casi exclusivamente en los microdominios de membrana (Figura 15).

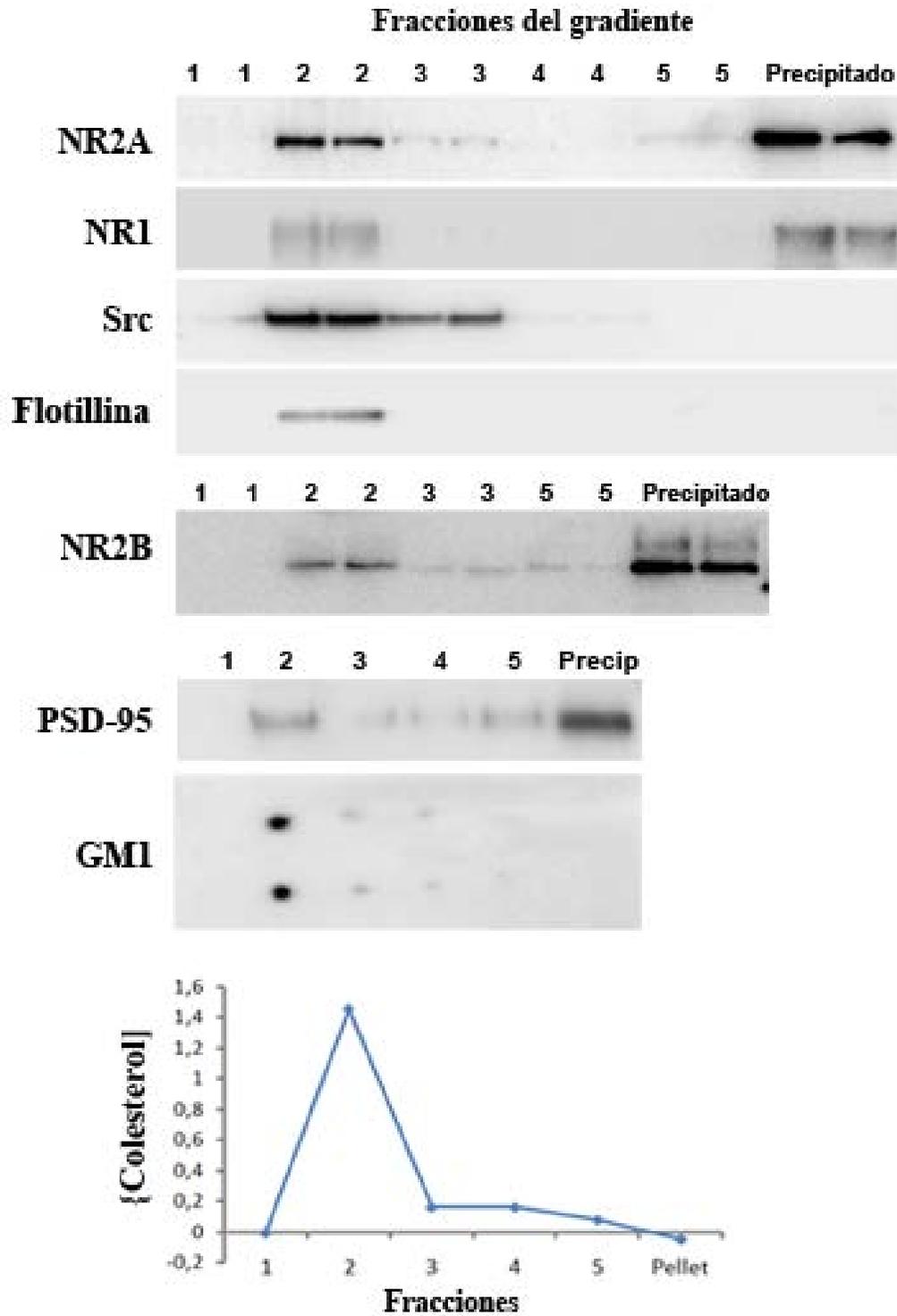


Figura 15. Distribución de las proteínas en el gradiente de sacarosa y el precipitado. Análisis mediante Western blot de las fracciones de dos gradientes preparados a partir de dos ratones silvestres independientes y análisis colorimétrico de distribución del colesterol.

Debido a que el receptor NMDA principalmente se localiza en la fracción 2 y en el precipitado se analizó la concentración de PSD-95 y de las subunidades NR1, NR2A y NR2B en estas fracciones mediante un Western blot específico para cada proteína. Como se puede observar en la figura 16, la ausencia de PSD-95 incrementa ligeramente la concentración de receptor NMDA compuesto por subunidades NR1 y NR2A, la concentración de NR2B no cambia. El inmunoblot para detectar PSD-95 muestra la ausencia de esta proteína en los ratones mutantes y adicionalmente muestra el incremento de otra proteína de alrededor de 100kD que de manera inespecífica reconoce el anticuerpo primario utilizado. Esta proteína es PSD-93 (se muestra más adelante en figura 17) otro miembro de la familia MAGUK, ya que por su similitud es frecuente que los anticuerpos hechos para detectar PSD-95 detecten también otras proteínas de la misma familia. El incremento de esta proteína de aproximadamente 100kD en los microdominios podría estar relacionado con el aumento de NR2A y NR1 ya que en ausencia de PSD-95, otras proteínas de la familia MAGUK principalmente PSD-93, pueden cumplir las funciones de PSD-95, entre ellas la formación de agregados de los receptores ¹¹⁹. Adicionalmente se midió la concentración de proteína, colesterol y GM1 en la fracción 2 del gradiente y en el precipitado, no se observaron cambios significativos en estos parámetros entre los ratones silvestres y los mutantes (Figura 16A). Como ya se mencionó anteriormente la fracción 2 está altamente enriquecida en colesterol y GM1, el resto de las fracciones no tienen cantidades detectables de estos lípidos.

En la figura 16C se muestra que no existen diferencias en la concentración total de receptor NMDA en el homogenizado crudo de los mismos ratones a partir de los cuales se aislaron los microdominios lipídicos.

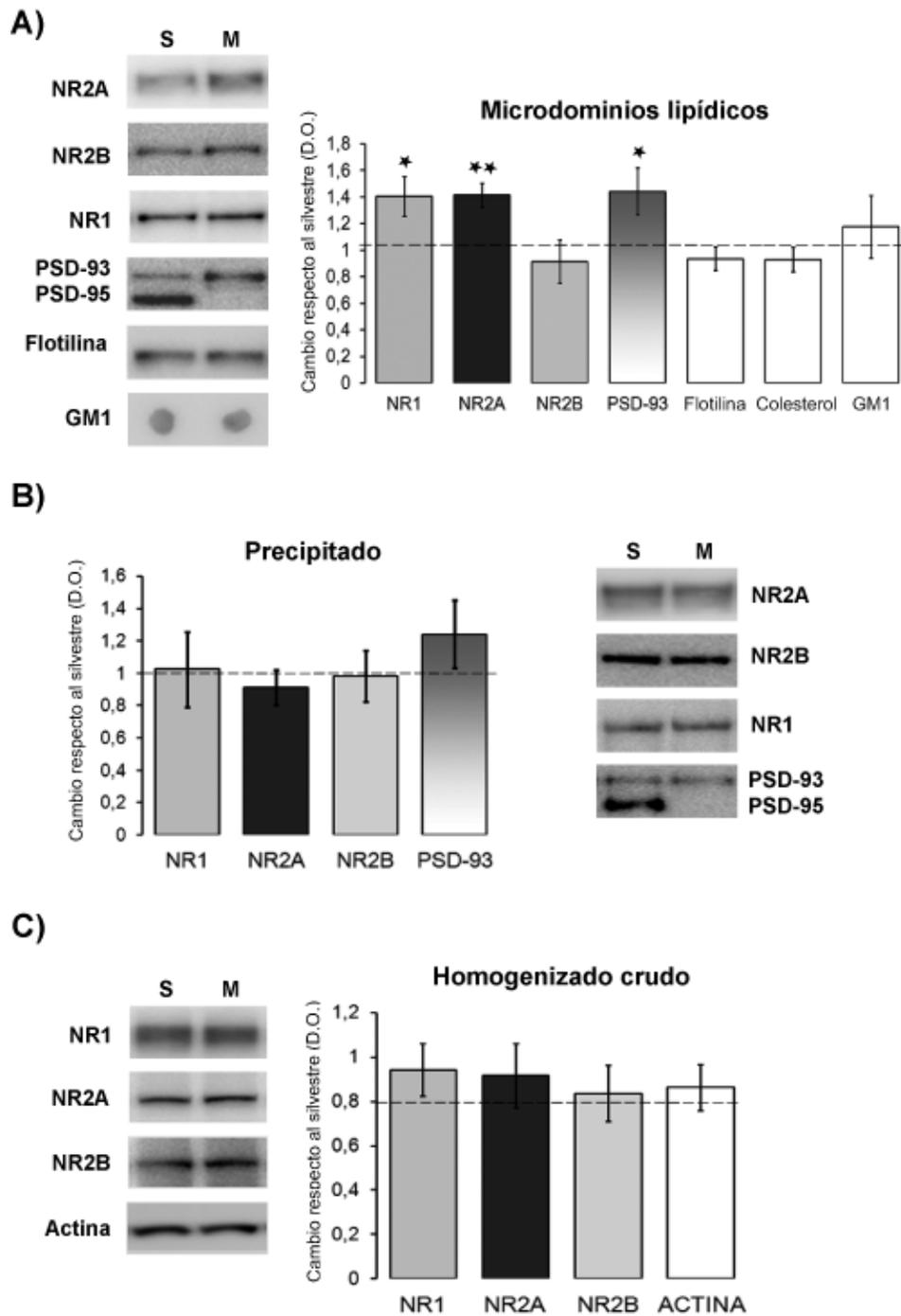


Figura 16. Efecto de la supresión de PSD-95 en la asociación del receptor NMDA con microdominios lipídicos. Los microdominios fueron aislados a partir de fracción insoluble de la corteza (1 animal por muestra) de animales PSD-95 ^{-/-} y silvestres, se extrajeron 5 fracciones y el precipitado del gradiente de sacarosa. A) Análisis mediante Western blot con la misma cantidad de proteínas del control y el silvestre en fracción 2 para detectar las subunidades del receptor NMDA, PSD-95 y PSD-93 (El anticuerpo utilizado para detectar PSD-95 también se une a PSD-93).

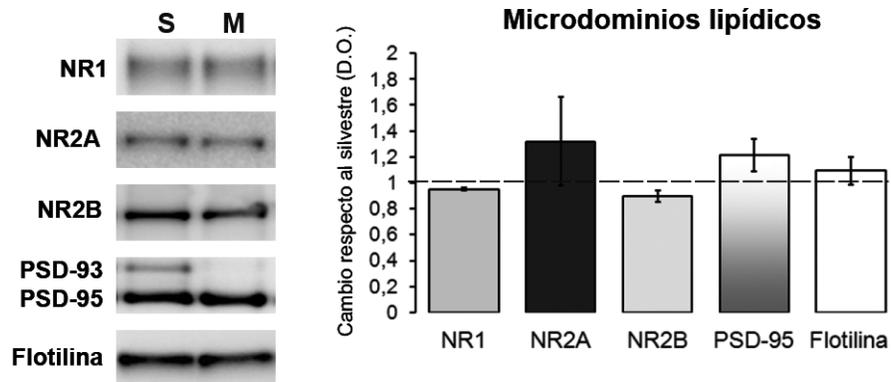
También se muestra el dot blot para detectar GM1. La gráfica muestra análisis densitométrico de las bandas de los blots y el análisis de la concentración de colesterol de 5 experimentos independientes, los resultados se muestran como promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al control (densidad óptica del PSD-95 +/- entre el silvestre). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Análisis mediante Western blot de las subunidades del receptor NMDA, PSD-93 y actina en el precipitado del gradiente (B) y en el homogenizado crudo (C). Las gráficas muestran el análisis densitométrico de las bandas como el promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al silvestre.

La supresión génica de PSD-93 no disminuyó la asociación del receptor NMDA con los microdominios lipídicos

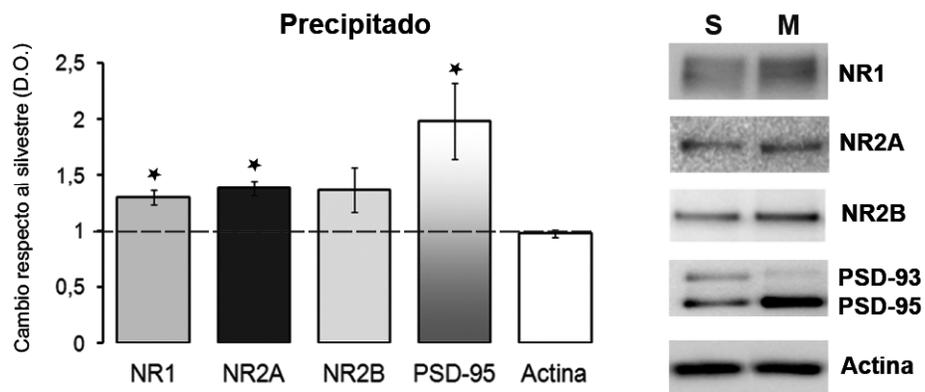
Como se mostró anteriormente la supresión de PSD-95 no produce una disminución de la concentración de receptor NMDA en los microdominios lipídicos, sino por el contrario lo que se observó fue un ligero aumento de receptores compuestos por NR1 y NR2A, con un aumento similar de PSD-93 en los microdominios. Estos resultados sugerían que PSD-93 podría tener un papel importante en la asociación del receptor NMDA a los microdominios de membrana por lo cual aumenta la concentración de receptor al incrementarse su presencia en estos microdominios. Por lo tanto se decidió analizar la concentración de receptor NMDA en los microdominios de ratones mutantes que carecen de esta proteína (PSD-93 -/-). Se aislaron los microdominios lipídicos a partir de la fracción insoluble obtenida de corteza de ratones silvestres y ratones PSD-93 -/-. La concentración de PSD-93, PSD-95, flotillina-1 y de las subunidades NR1, NR2A y NR2B, en la fracción 2 fue analizada mediante un Western blot. Como se puede observar en la figura 17, la ausencia de PSD-93 no produce cambios en los microdominios de membrana, mientras que en el precipitado incrementa la concentración de PSD-95 y receptor NMDA (NR1/NR2B). El incremento en PSD-95 es mucho mayor,

aproximadamente 70%, mientras que la concentración del receptor se incrementa aproximadamente en un 25%. En la figura 17C se muestra que no existieron diferencias en la concentración total de receptor NMDA en el homogenizado crudo de los mismos ratones a partir de los cuales se aislaron los microdominios lipídicos.

A)



B)



C)

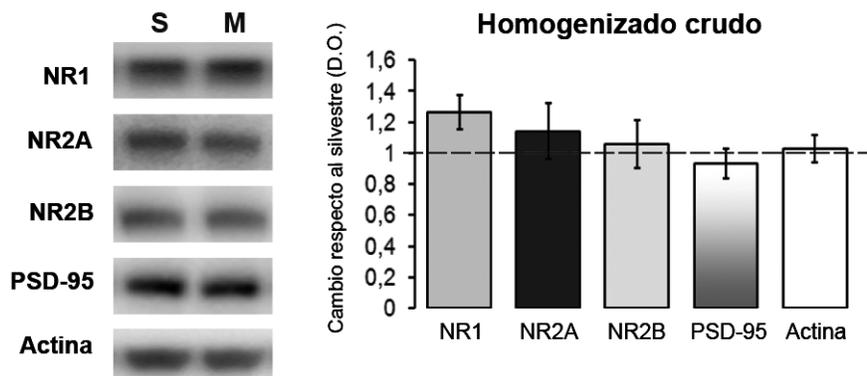


Figura 17. Efecto de la supresión de PSD-93 en la asociación del receptor NMDA con microdominios lipídicos. Los microdominios fueron aislados a partir de la fracción insoluble de la corteza (1 animal por muestra) de animales PSD-93 ^{-/-} y silvestres, se extrajeron 5 fracciones y el precipitado del gradiente de sacarosa. Análisis con la misma cantidad de proteínas de la fracción 2 (A) y el precipitado (B) de las subunidades del receptor NMDA, PSD-95 (El anticuerpo utilizado para detectar PSD-95 también se une a PSD-93), flotillina o actina mediante Western blot. Las gráficas muestran el análisis densitométrico de las bandas de los blots de 4 experimentos independientes, los resultados se muestran como promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al control (densidad óptica del PSD-93^{-/-} entre el silvestre). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. C) Análisis mediante Western blot de las subunidades del receptor NMDA, PSD-95 y actina en el homogenizado crudo. La gráfica muestra el análisis densitométrico de las bandas como el promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al silvestre.

La eliminación de la valina 1482 de la subunidad NR2B afectó la asociación del receptor NMDA con los microdominios.

Se ha reportado ampliamente que existe una redundancia de funciones entre las proteínas de la familia MAGUK por lo que una pueden ser sustituida por las otras, la supresión de una de ellas se ha reportado que incrementa la expresión de otras ^{118, 119}. En este trabajo también se demuestra que la supresión de PSD-95 incrementa la cantidad de PSD-93 en los microdominios mientras que la supresión de PSD-93 incrementa la cantidad de PSD-95 en el precipitado enriquecido en densidades postsinápticas. Debido a ello se decidió analizar el efecto de la eliminación de la valina 1482 la cual es parte la secuencia de unión a dominios PDZ. Como se mencionó anteriormente, el receptor NMDA interactúa con las proteínas de la familia MAGUK a través de este dominio de unión, el cual está compuesto por la secuencia SDV en el carboxilo terminal, la mutación de uno de los tres aminoácidos dafecta su interacción con los dominios PDZ.

Se aislaron los microdominios lipídicos a partir de la fracción insoluble obtenida de la corteza de ratones silvestres y ratones mutantes que tienen una mutación que elimina la valina 1482 (DV). Se colectaron 5 fracciones del gradiente y el precipitado. La concentración de las subunidades NR1, NR2A, NR2B y PSD-95 en cada fracción fue analizada mediante un Western blot específico para cada proteína examinando en el gel la misma cantidad de proteína de la fracción 2 y el precipitado.

Como se puede observar en la figura 18, la ausencia de la valina disminuyó aproximadamente 40% la concentración de subunidades NR1 y NR2B del receptor NMDA en los microdominios lipídicos, sin embargo también se observa una disminución de alrededor de 30% de las subunidades NR1 y NR2A en el precipitado que está enriquecido principalmente en densidades postsinápticas, interesantemente la subunidad NR2A aumenta aproximadamente en la misma proporción en el precipitado, pero no en los microdominios (Figura 18A y B). Sin embargo, cuando se midió la concentración de proteínas de las fracciones 2 del gradiente para analizar mediante el Western blot la misma cantidad de proteínas, nos dimos cuenta que la concentración de proteína total en el mismo volumen de muestra era mayor en los ratones mutantes que los controles. También se midió la concentración de colesterol y GM1, encontramos diferencia significativa en la concentración de los tres parámetros en las fracciones 2 (microdominios lipídicos). Los ratones mutantes tuvieron alrededor de 30% más que los ratones silvestres, mientras que no hay diferencia significativa en la concentración de proteína total en el precipitado o en la fracción 5. La cantidad de colesterol y GM1 no es detectable en el precipitado ni en la fracción 5, por lo cual, se midió en la fracción soluble y se observó que la concentración de colesterol y GM1 no se afectan por la mutación.

También se midió la cantidad de colesterol en la fracción insoluble a partir de la cual se separan los microdominios, en esta fracción también se detectó un cambio significativo aunque un poco menor que en la fracción de microdominios lipídicos (Figura 18C). Estos resultados inesperados indican que la mutación de la valina terminal incrementa la concentración total de microdominios lipídicos que fueron aislados por el gradiente de sacarosa.

El incremento en la concentración de microdominios causó que la cantidad total de receptor NMDA en la fracción 2 permanezca similar entre los ratones silvestres y los mutantes, aunque su concentración con respecto a la cantidad de proteínas de los microdominios sea menor en los ratones mutantes.

Se midió también la concentración total de receptor NMDA en el homogenizado crudo a partir de los cuales se aislaron los microdominios lipídicos. Se detectó una ligera pero significativa disminución de aproximadamente 20% en los ratones mutantes de las subunidades NR1 y NR2B (Figura 18D).

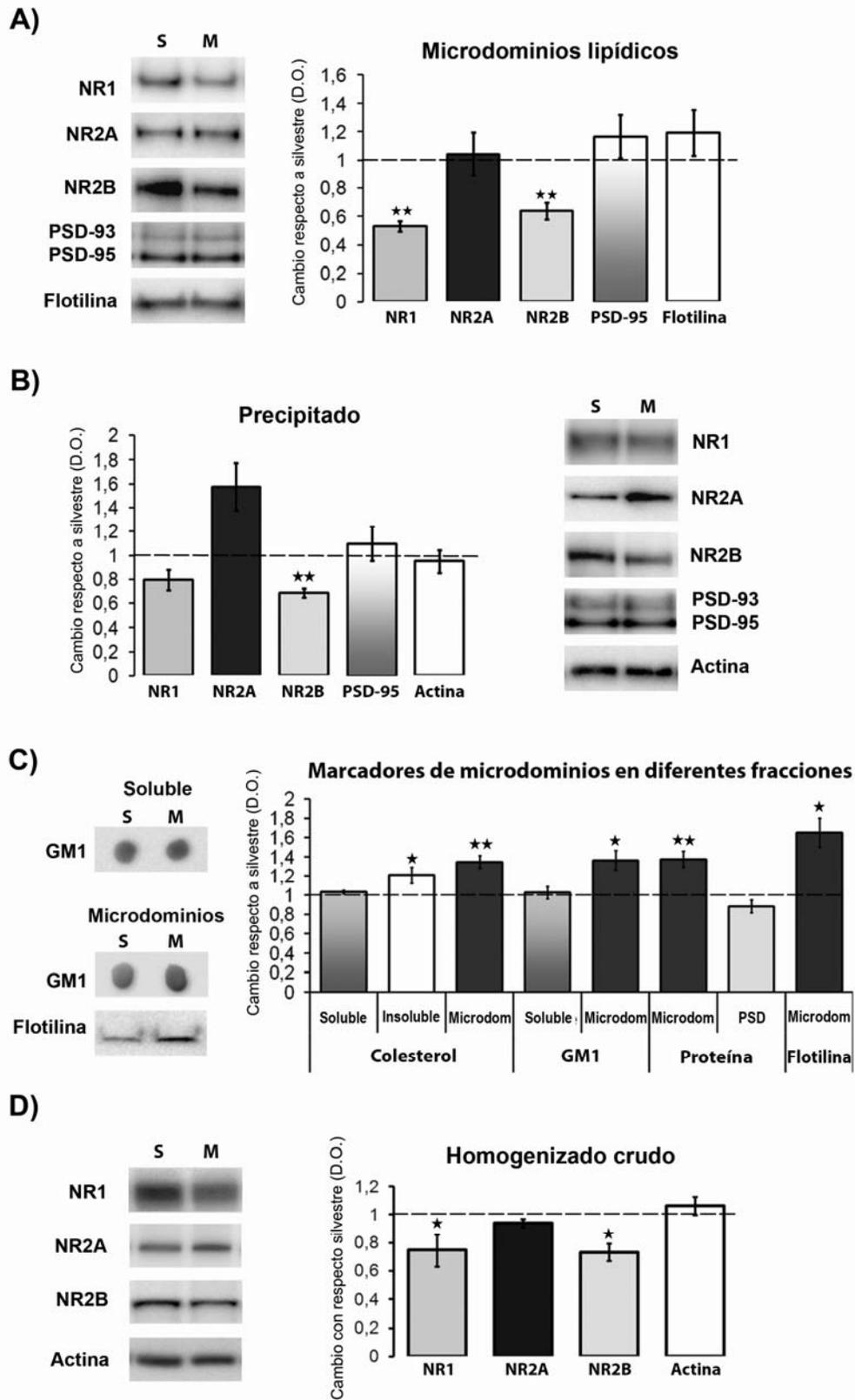


Figura 18. Efecto de la eliminación de la valina 1482 de la subunidad NR2B (DV^{-/-}) en la asociación del receptor NMDA con microdominios lipídicos. Los microdominios fueron aislados a partir de

fracción insoluble de la corteza (1 animal por muestra) de animales DV -/- y silvestres, se extrajeron 5 fracciones y el precipitado del gradiente de sacarosa. A) Análisis mediante Western blot con igual cantidad de proteínas de la fracción 2 y el precipitado (B) para detectar las subunidades del receptor NMDA, PSD-95, flotillina o actina. Las gráficas muestran los análisis densitométricos de 6 experimentos independientes. C) Análisis con el mismo volumen de muestra de GM1 (dotblot), flotillina-1 (Western blot), colesterol (ensayo calorimétrico) proteínas (método de Bradford) en la fracción 2, la fracción soluble y de la fracción insoluble que se obtienen antes de realizar el gradiente de sacarosa. D) Análisis mediante Western blot de las subunidades del receptor NMDA y actina en 20µg homogenizado crudo. Los resultados se muestran como promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al silvestre (densidad óptica del DV -/- entre el silvestre). * $p < 0.05$. * $p < 0.05$.

La eliminación del dominio carboxilo terminal de la subunidades NR2A redujo la asociación de los receptores NMDA con los microdominios lipídicos

Como se mostró anteriormente, la eliminación de la valina de la secuencia de unión a dominios PSD de la subunidad NR2B disminuyó la concentración del receptor NMDA con subunidades NR2B en aproximadamente 40%. Es posible que el receptor NMDA interaccione con las proteínas de la familia MAGUK mediante otro dominio en su carboxilo terminal. Debido a ello, se analizó el efecto de la mutación del carboxilo terminal de las subunidades del receptor NMDA sobre su localización en los microdominios de membrana.

Se aislaron microdominios de membrana a partir de la fracción insoluble del tejido cortical de ratones silvestres y mutantes DC-/- que carecen del dominio carboxilo terminal de la subunidad NR2A. Debido a que los ratones homocigotos que carecen del carboxilo terminal de la subunidad NR2B mueren perinatalmente, no fue posible analizar esta mutación. Como se muestra en la figura 19 los ratones mutantes del carboxilo terminal NR2A-/- tienen una disminución de

aproximadamente 70% de la subunidad NR1, mientras que la concentración de NR2B no cambia significativamente. En el precipitado también existe un cambio en la subunidad NR1, sin embargo este cambio es menor (30%). La concentración de proteína total en los microdominios y en el precipitado no cambio al igual que la cantidad de colesterol y gangliósido GM1. No hemos podido detectar la subunidad NR2A en los ratones DC -/- ya que la mayoría de anticuerpos reconocen el carboxilo terminal de la subunidad. Existen algunos anticuerpos comerciales que reconocen el amino terminal, sin embargo se han probado dos de ellos y no se logró detectar a la proteína en ratones silvestres. Sin embargo, debido a la gran disminución de la subunidad NR1 es posible suponer que la subunidad NR2A también debe disminuir en la misma o mayor proporción en los microdominios lipídicos ya que la subunidad NR2B no cambia.

También se midió la concentración de receptor NMDA en el homogenizado crudo a partir del cual los microdominios fueron aislados. Como se muestra en la figura 19C, se detectó una disminución de aproximadamente 30% en la cantidad de NR1.

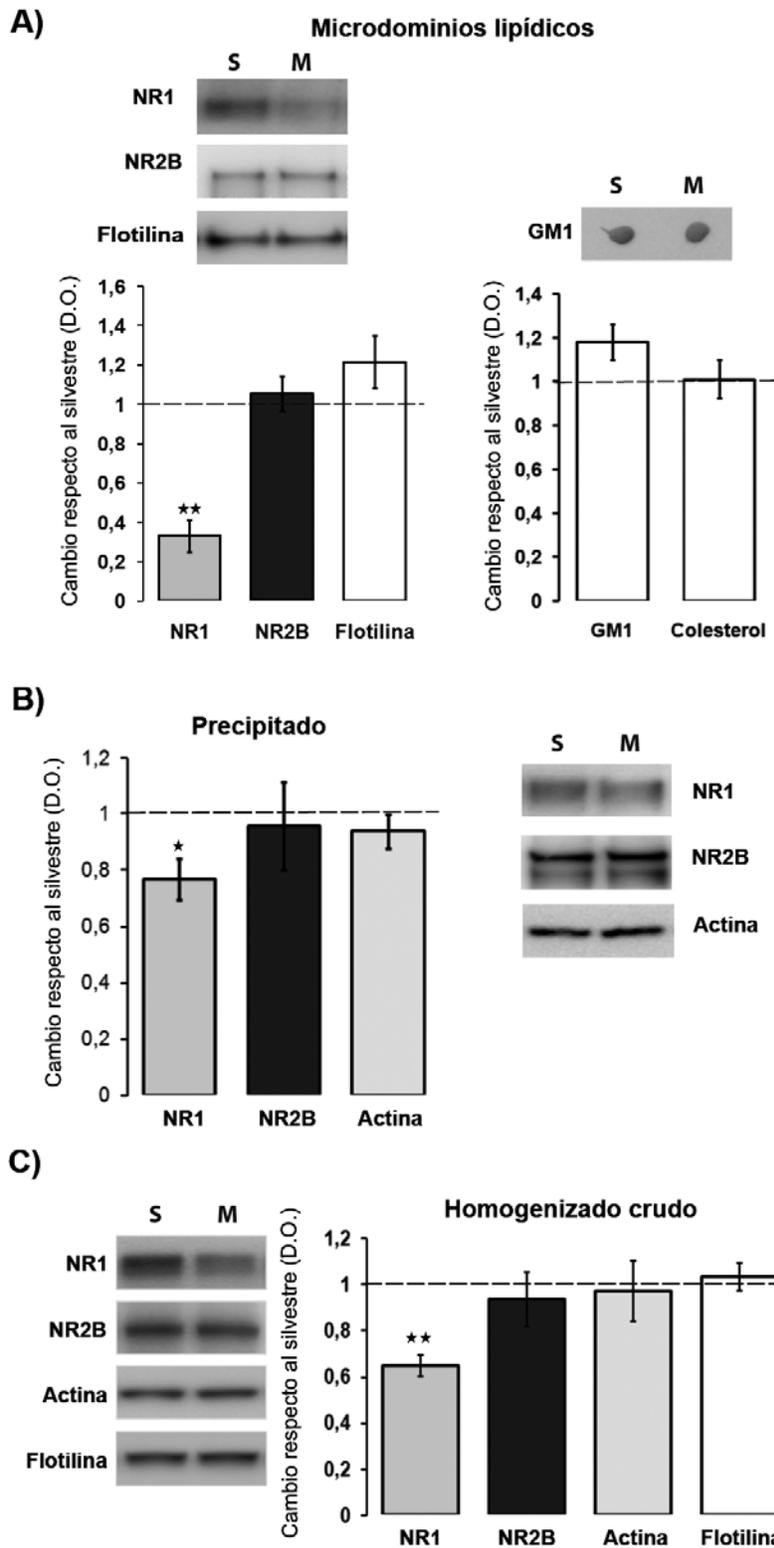


Figura 19. Efecto de la eliminación del carboxilo terminal de la subunidad NR2A (DC $-/-$) en la asociación del receptor NMDA con microdominios lipídicos. Los microdominios fueron aislados a partir de fracción insoluble de la corteza (1 animal por muestra) de animales DC $-/-$ y silvestres, se

extrajeron 5 fracciones y el precipitado del gradiente de sacarosa. A) Análisis mediante Western blot con la misma cantidad de proteínas del control y el silvestre en fracción 2 para detectar las subunidades del receptor NMDA y flotilina. En el lado derecho se muestra el dot blot para detectar GM1 y el análisis del colesterol a partir del mismo volumen de muestra. La gráfica muestra análisis densitométrico de 4 experimentos independientes. B) Análisis mediante Western blot de las subunidades del receptor NMDA y actina en el precipitado del gradiente y en el homogenizado crudo (C). La gráfica muestran el análisis densitométrico de las bandas como promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al control (densidad óptica del DV -/- entre el silvestre). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

PSD-95 KO						
	NR1	NR2A	NR2B	PSD-93	ACTINA	FLOT
Microdominios	1.40	1.41	0.91	1.44		0.93
PSD (Precipitado)	1.03	0.91	0.98	1.24		
Total	1.06	1.09	1.20	1.16	0.90	

PSD-93 KO						
	NR1	NR2A	NR2B	PSD-95	ACTINA	FLOT
Microdominios	0.90	1.18	0.84	1.12		1.09
PSD (Precipitado)	1.44	1.42	1.40	2.02	0.97	
Total	1.26	1.14	1.06		1.03	0.95

NR2B DV						
	NR1	NR2A	NR2B	PSD-95	ACTINA	FLOT
Microdominios	0.53	1.04	0.64	1.17		1.12
PSD (Precipitado)	0.79	1.57	0.68	1.09	1.05	
Total	0.79	0.94	0.73	1.06	1.06	

NR2A DC						
	NR1	NR2A	NR2B	PSD-95	ACTINA	FLOT
Microdominios	0.33		1.05			1.22
PSD (Precipitado)	0.77		0.96		0.91	
Total	0.65		0.94		0.97	1.03

Tabla 1. Resumen de resultados de los ratones mutantes. Resultados del análisis densitométrico de los blots donde se analizaron las proteínas indicadas en la fracción 2 (microdominios), en el precipitado (PSD) de los gradientes de sacarosa y en el homogenizado total. Los resultados se expresan como promedio del cambio con respecto a los ratones silvestres, en rojo se muestran los incrementos y en azul los decrementos estadísticamente significativos.

Discusión y conclusiones

Nuestros resultados muestran que en la CI, el entrenamiento en el laberinto acuático induce translocación de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor NMDA hacia los microdominios lipídicos. Este entrenamiento no cambia la síntesis de las subunidades o la concentración de microdominios aislados. El incremento de receptores en los microdominios lipídicos podría ser el resultado de la inserción de receptores a la membrana provenientes de pozas intracelulares o del desplazamiento lateral desde regiones solubles de la membrana hacia los microdominios lipídicos. Sin embargo, cuando se aislaron los sinaptosomas, los cuales conservan la membrana y densidad postsináptica, no se observó un incremento de ninguna de las subunidades del receptor NMDA en la membrana sinaptosomal, por lo que se puede concluir que el entrenamiento no indujo inserción de nuevos receptores en la sinapsis. Sin embargo en la misma fracción sinaptosomal se observó un incremento de la concentración receptor NMDA en los microdominios lipídicos con un decremento en la densidad postsináptica. Estos resultados sugieren que los receptores NMDA reclutados en los microdominios provienen de la región de la membrana soluble asociada a la densidad postsináptica.

Nosotros usamos el método descrito por Besshoh con algunas modificaciones para aislar los sinaptosomas y los microdominios lipídicos de la membrana sináptica. Como reportó Besshoh y colaboradores, los microdominios preparados de sinaptosomas son heterogéneos, potencialmente contienen microdominios derivados de regiones postsinápticas, perisinápticas y extrasinápticas así como también de la terminal presináptica, por lo que es difícil

determinar el origen exacto de los receptores NMDA que son reclutados en los microdominios.

Adicionalmente, en nuestro trabajo se demuestra que un día de entrenamiento en el laberinto acuático induce en la CI la fosforilación de la tirosina 1427 de la subunidad NR2B, sin que se observe una diferencia en la fosforilación total en tirosinas del receptor. En el receptor NMDA se han descubierto 3 sitios de fosforilación en tirosina en la subunidad NR2B y 3 en la subunidad NR2A. La regulación de la fosforilación de estos sitios se sabe que ocurre de manera diferencial y que puede ser mediada por diferentes cinasas ¹²⁰. Sin embargo la fosforilación en tirosinas de la subunidad NR2B está al menos parcialmente mediada por una cascada de señalización que involucra la activación secuencial de PKC, Pyk2 y de la cinasas de la familia Src ³⁷. Nakazawa y colaboradores (2002) identificaron a la tirosina 1472 de NR2B como el principal sitio *in vitro* de fosforilación por la cinasa fyn (miembro de la familia de cinasas Src). Estos investigadores también reportaron que la fosforilación en este residuo se incrementa después de la inducción de LTP en el hipocampo, lo cual sugiere que está involucrado en procesos de plasticidad sináptica ¹⁹.

Se ha reportado que esta fosforilación posiblemente no regula la conductividad del canal del receptor ¹²¹. Recientemente demostraron que la mutación en la tirosina 1472 causa la localización del receptor NMDA en la región periférica de la sinapsis y también afecta la formación de la memoria ²⁰. El grupo de Besshoh (2005) reportó que después del tratamiento de isquemia y reperfusión la fosforilación de la tirosina 1472 se incrementaba tanto en la densidad postsináptica como en los microdominios. Sin embargo el incremento fue mayor en los receptores asociados al microdominio. Nosotros no logramos detectar la

fosforilación de la tirosina 1472 dentro de los microdominios debido a que para detectar la fosforilación de este residuo, tuvimos que realizar una la inmunoprecipitación de la subunidad NR2B antes de realizar el Western blot. Lo cual no se logró realizar en la fracción de microdominios lipídicos. Sin embargo, analizando la fosforilación en lisado crudo, encontramos que en la CI el entrenamiento induce la fosforilación tirosina 1472 y la translocación de la subunidad NR2B a los microdominios y mientras que en el hipocampo el entrenamiento no induce la fosforilación de esta tirosina ni la translocación de la subunidad NR2B. Tomando en cuenta estos datos en conjunto con lo reportado por Besshoh, se puede concluir que la fosforilación de la tirosina 1472 correlaciona con su localización en los microdominios de membrana. Sin embargo no se puede concluir si esta fosforilación es una señal que induce la translocación del receptor o es una consecuencia de que el receptor se relocalice en este microdominio y por lo tanto se encuentre en mayor contacto con la cinasa fyn que lo fosforila, ya que esta cinasa está concentrada en estos microdominios.

Nuestros resultados son consistentes con un modelo que implica una mayor eficiencia en la señalización intracelular mediada por el receptor NMDA cuanto este receptor se incorpora a los microdominios. Estos cambios en la eficiencia de la señalización mediada por el receptor NMDA conducirían al incremento en la fuerza de la actividad sináptica lo cual se cree que subyace los eventos de plasticidad sináptica, entre ellos la formación de la memoria.

Por otra parte, el hecho que el entrenamiento espacial reclute hacia los microdominios a la subunidad NR2A y no a la subunidad NR2B sugiere que dentro de los microdominios las proporciones de los subunidades que forman a los receptores NMDA cambian con el entrenamiento. Lo cual cambiaría las

características de la corriente de Ca^{2+} que entra través del receptor exclusivamente en esta región de la membrana. Este resultado también sugiere que la función de las subunidades NR2 es diferente en las diversas estructuras que están involucradas en el aprendizaje de una tarea espacial. Es posible que la subunidad NR2B intervenga en el hipocampo durante este aprendizaje, por lo cual no se induce su fosforilación ni su translocación a los microdominios. Liu y colaboradores (2004) mostraron que el bloqueo selectivo de las subunidad NR2B en el hipocampo evita la inducción de LTD sin afectar LTP, por el contrario, la inhibición de NR2A bloquea la inducción de LTP pero no la de LTD ¹²². Sin embargo, existen otros estudios donde se demuestra la participación de ambas subunidades en la inducción de LTP en ratas de dos semanas de edad ¹²³ y en ratones de 28 días ¹²⁴. Adicionalmente un estudio realizado con oligonucleótidos antisentido para disminuir la expresión de la subunidad NR2B demostró que el tratamiento en el hipocampo de ratas evita la inducción de LTP y afecta el aprendizaje espacial ¹²⁵. En la corteza también se ha observado la intervención de ambas subunidades durante LTP y condicionamiento de miedo contextual ¹²⁶. Esta variabilidad en los datos muestra que la participación de la subunidad NR2B durante la inducción de plasticidad sináptica cambia con el modelo y protocolo de estimulación utilizado. Con el protocolo de entrenamiento utilizado en este trabajo (solo 10 ensayos en una sesión) los resultados sugieren que en el hipocampo no es necesario un reclutamiento ni fosforilación de la subunidad NR2B. Sin embargo en CI si es necesario el reclutamiento y fosforilación de ambas subunidades NR2. Teóricamente el reclutamiento de subunidades NR2B permitiría una mayor entrada de Ca^{2+} en los microdominios que el reclutamiento de subunidades NR2A, ya que esta última tiene una cinética de desactivación más rápida y una menor

conductancia que la subunidad NR2B¹²⁷⁻¹²⁹. Posiblemente en la corteza es necesaria un mayor incremento de calcio en los microdominios que en el hipocampo, ya que es probable que el hipocampo sea más susceptible a sufrir cambios plásticos. La intensidad de la estimulación requerida para inducir LTP en el hipocampo generalmente es menor a la requerida en la corteza^{122, 130}. Por esta razón es posible que en la CI se requiera la colaboración de las subunidades NR2B con mayor conductancia al Ca²⁺ para inducir el cambio plástico, mientras que en el hipocampo la participación de las subunidades NR2A es suficiente. Sin embargo como se muestra en este trabajo después 5 días de entrenamiento la fosforilación total en tirosina de la subunidad NR2B si se incrementa en el hipocampo (la fosforilación de la tirosina 1472 no fue medida). En la CI la fosforilación total no cambió con 5 días de entrenamiento. Como se mencionó anteriormente al medir la fosforilación total de la subunidad NR2B mediante inmunoprecipitación de la subunidad y Western blot contra tirosinas fosforiladas, se detecta la fosforilación de todos los residuos que tiene la subunidad NR2B y de los residuos de la subunidad NR2A que co-precipita con la NR2B. Por lo tanto, es difícil interpretar que ocurre cuando se detecta un incremento en la fosforilación con este tipo de método, pues como ya se ha reportado, la fosforilación de los diferentes residuos de las subunidades NR2 es diferente en respuesta a un mismo estímulo, mientras que la fosforilación de un residuo puede incrementarse otro disminuye, además de que la fosforilación de cada residuo tiene un efecto diferente en el receptor. Por lo tanto se concluye que el uso de un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas para medir la fosforilación del receptor NMDA no es de utilidad para estudiar qué está ocurriendo con la fosforilación del receptor.

Se desconoce si durante el entrenamiento en el laberinto acuático ocurre el reclutamiento de otras proteínas a los microdominios de membrana. PSD-95 se une a varios receptores, entre ellos los AMPA, es posible que el reclutamiento de PSD-95 a los microdominios permita la translocación de otras proteínas. Sin embargo este trabajo muestra la especificidad del reclutamiento de los receptores a los microdominios de membrana. No todas las proteínas capaces de unirse a PSD95 son reclutadas a los microdominios, ya que en hipocampo son reclutadas durante el entrenamiento las subunidades NR2A y NR1 mientras que la subunidad NR2B permanece estable. En corteza parietal en la cual no se ha reportado la intervención de los receptores NMDA en el aprendizaje espacial no ocurre esta translocación. Otros datos del laboratorio que no han sido publicados muestran que en hipocampo la cinasa dependiente de calcio PKC también se recluta a microdominios de membrana y que en CI no ocurre esta translocación. Todos estos resultados muestran la especificidad del reclutamiento de proteínas a los microdominios de membrana durante el entrenamiento en el laberinto acuático.

Uno de los puntos controversiales en el estudio de los microdominios de membrana es que las porciones de las proteínas aisladas con los microdominios de membrana no son constantes. Besshoh y colaboradores reportaron aproximadamente 60% de la población de proteínas PSD-95 aislada en los microdominios de membrana, mientras que estudios previos han reportado solo un 10% de esta proteína asociada a microdominios lipídicos^{60, 61, 67, 71}. Las razones de esta variación no se conocen, sin embargo se ha postulado que están relacionadas con las diferentes condiciones de la extracción, particularmente a la razón entre la concentración de proteína y la de detergente. El incremento en la concentración de

detergente incrementa la solubilización de las proteínas y rompe las interacciones débiles entre ellas y los microdominios lipídicos ¹³¹. Besshoh y colaboradores utilizaron una razón 1:1 entre el detergente y la proteína, en este trabajo para aislar los microdominios realizamos una mayor solubilización utilizando un radio aproximado de 0.2:1 (0.35:1 en los experimentos con ratones) para aislar los microdominios a partir de fracción insoluble y 0.06:1 para los microdominios sinápticos. Por lo tanto, condiciones utilizadas en este trabajo fueron de mayor astringencia lo cual podría explicar que se obtuviera una proporción de proteínas asociadas a los microdominios de membrana mucho menor a las reportadas por Besshoh, Sin embargo, estas proteínas deben estar fuertemente asociadas a los microdominios.

Los receptores NMDA no son proteínas aciladas, así que para asociarse a los microdominios de membrana es probable que requieran asociarse a otra proteína que se localice en estos microdominios. El receptor NMDA está fuertemente asociada a proteínas de andamiaje de la familia MAGUK, PSD-95 es el más abundante miembro de esta familia. PSD-95 al igual que el receptor NMDA se transloca a los microdominios de membrana durante el entrenamiento en el laberinto acuático. Esta proteína es importante para la localización sináptica y la señalización del receptor NMDA, tiene dos cisteínas palmitoiladas en la región N-terminal que le permiten asociarse con los microdominios lipídicos ^{132, 133}. Varios estudios han mostrado que la región C-terminal T/SXV de las subunidades NR2A y NR2B puede unirse directamente con los dominios PDZ de PSD-95. Hay varios trabajos que sugieren que esta interacción induce agregamiento postsináptico del los receptores NMDA. ^{37, 38, 134} y que la palmitoilación de PSD-95 es esencial para la formación de estos agregados. No puede ser reemplazada por otros motivos de

asociación con membrana, lo cual sugiere que la interacción con los microdominios lipídicos está involucrada en la formación de agregados NMDAR-PSD-95^{132, 133}. La participación de microdominios en la formación de agregados de otros receptores ya ha sido estudiada^{135, 136}. La formación de agregados de receptores de acetilcolina requiere la asociación con rapsyna, una proteína miristoilada de la placa neuromuscular^{22, 137} que se localiza constitutivamente en los microdominios y recluta al receptor de acetilcolina en respuesta a agrina. La disrupción de los microdominios inhibe la formación de agregados de este receptor¹³⁸.

En el cerebro, los mecanismos que involucran la formación de agregados y la translocación a los microdominios ha sido poco estudiada. Sin embargo, en sinapsis glutamatérgicas PSD-95 podría ejercer una función equivalente a la rapsyna en la unión neuromuscular. PSD-95 podría ser responsable de la asociación del receptor NMDA con los microdominios pues se sabe que es capaz de inducir formación de agregados y reclutamiento a microdominios de otras proteínas no aciladas. Se ha reportado que la co-expresión de PSD-95 incrementa la formación de agregados y la asociación con microdominios del canal dependiente de voltaje Kv1.4 y del receptor para neuroregulina ErbB4. La supresión del dominio de unión a PSD-95 o de la palmitoilación de esta última elimina este reclutamiento⁶⁰. Tomado en cuenta esta evidencia, nuestros resultados sugerían que el reclutamiento de PSD-95 durante el aprendizaje espacial causa reclutamiento del receptor NMDA.

El doctor Seth Grant en el Reino Unido reportó que ratones mutantes que carecen de PSD-95 tienen deficiencia en el aprendizaje de la tarea en el laberinto acuático de Morris^{118, 139}. Sin embargo estos ratones tienen la misma concentración de receptor NMDA en la sinapsis. Como se muestra en la figura 16

se analizó en estos ratones la concentración de las subunidades del receptor NMDA en los microdominios lipídicos. Los microdominios fueron aislados a partir de fracción insoluble de toda la corteza del ratón. Debido al tamaño del cerebro de los ratones en comparación con las ratas no fue posible aislarlos a partir de CI, ya que se hubiera requerido de aproximadamente 6 ratones mutantes por muestra. La figura 16 indica que estos ratones que carecen de PSD-95 tienen un ligero incremento en la concentración de NR2A y NR1 en los microdominios de membrana, la concentración de NR2B no cambia. Estos resultados sugieren que PSD-95 no interviene en la asociación del receptor NMDA a los microdominios de membrana. Sin embargo, se ha reportado que en ausencia de uno de los miembros de familia MAGUK, los otros miembros pueden tomar su función a lo que se le llama redundancia de funciones ^{118, 119}. En general las supresiones genéticas de miembros de la familia MAGUK tienen efectos mínimos en la transmisión sináptica basal o en la inducción de LTP. Este mutante que carece de PSD-95 funcional tiene defectos mínimos en la transmisión sináptica basal, solo un LTP incrementado y ausencia de LTD ¹¹⁸. Los mutantes de PSD-93 no tienen defectos detectables en la estructura o función de la sinapsis, en la transmisión sináptica basal o en LTP ¹⁴⁰.

Las proteínas de la familia MAGUK comparten una estructura modular semejante con 5 dominios de interacción proteína-proteína; específicamente, tres dominios N-terminal PDZ son seguidos por un dominio SH3 y un dominio enzimáticamente inactivo GK ^{12, 141}. Una diferencia importante entre los miembros es la palmitoilación en la región N terminal. La principal isoforma (alfa) de PSD-95 y PSD-93 tienen dos secuencias de palmitoilación, los cuales son importantes para su destino sináptico, la isoforma beta no lo tiene. La isoforma alfa de SAP-97 también tiene palmitoilaciones, sin embargo esta isoforma se expresa en menor

cantidad que la isoforma beta que no la tiene. La palmitoilación de todas las proteínas de esta familia les permiten formar agregados entre sí y con receptores como el AMPA y el NMDA ^{142, 143}. En cultivo neuronal se ha reportado que el silenciamiento de la expresión de PSD-95 causa un decremento de la transmisión sináptica mediada por receptores AMPA. La expresión heteróloga de las isoformas palmitoiladas de PSD-95 y SAP97 rescata e incrementa en más del doble esta transmisión ¹¹⁹. Por otra parte, el ratón mutante de PSD-95 que analizamos en este trabajo sobrexpresas SAP-102 otro de los miembros de la familia MAGUK. Sin embargo esta proteína no está palmitoilada y no está involucrada en la formación de agregados de receptores. No se ha estudiado la expresión de SAP97, pero existe la posibilidad que la isoforma palmitoilada se encuentre sobreexpresada al igual que SAP-102. La expresión de PSD-93 no se modificó en estos ratones mutantes, sin embargo como se puede ver en la figura 17, la concentración de esta proteína está ligeramente aumentada en los microdominios de membrana, lo cual sugiere que esta PSD-93 podría ser la responsable del incremento en la asociación del receptor con los microdominios en ausencia de PSD-95. Sin embargo en este trabajo también se demuestra que la supresión de PSD-93 no afectó la concentración de receptores NMDA en los microdominios. En la fracción enriquecida en densidades postsinápticas se puede ver un incremento notable de PSD-95 con un incremento discreto 25% de las subunidades NR1 y NR2B del receptor NMDA, pero esto no ocurre en los microdominios. Estos datos podrían indicar que el incremento en la cantidad de alguna proteína de la familia MAGUK causado por la eliminación de otra de ellas causa el incremento de la concentración de receptor NMDA. Esto sucede en los microdominios lipídicos en ausencia de PSD-95 y en la fracción enriquecida en densidades postsinápticas en ausencia de

PSD-93. Sin embargo las razones de este incremento diferencial inducido por la mutación de PSD-95 o PSD-93 es difícil de explicar, es necesario realizar más experimentos para intentar aclarar este punto.

Como se mencionó anteriormente las subunidades NR2 del receptor NMDA se unen a las proteínas de la familia MAGUK mediante la secuencia SDV al final del carboxilo terminal por lo cual se estudio la asociación del receptor NMDA en ratones mutantes que carecen de esta última valina del carboxilo terminal de la subunidad NR2B. Como se muestra en la figura 18, estos ratones tienen una menor concentración de la subunidad NR2B y de la subunidad NR1, con respecto a la concentración de proteína de los microdominios, tanto en los microdominios de membrana como en la fracción enriquecida en densidades postsinápticas. La subunidad NR2A no cambia significativamente en los microdominios y aumenta aproximadamente un 30% en la fracción enriquecida en densidades postsinápticas. Sin embargo, estos ratones también tienen un incremento de 30% en la concentración de proteína total, flotilina, GM1 y colesterol en específicamente en la fracción de microdominios lipídicos. Este incremento de aproximadamente 30% de los microdominios compensa la disminución de aproximadamente 40% en la concentración del receptor en los microdominios. Por lo cual, la cantidad total de receptor en los microdominios es similar entre el los ratones mutantes y los silvestres. Estos resultados sugieren que la mutación de la valina del dominio de unión a PSD causa la disociación entre el receptor y las proteínas de la familia MAGUK lo cual disminuye la concentración de receptor en los microdominios. Sin embargo, el incremento en la concentración de microdominios podría ser un proceso de compensación que incrementa la síntesis de microdominios lipídicos, dando como resultado la nivelación de la cantidad total de receptor NMDA en

comparación con el control. Datos del laboratorio del Dr. Grant, que aun no han sido publicados, indican una disminución en la corrientes posinápticas excitatorias evocadas (EPSC), el tiempo de deactivación es aproximadamente 30% menor, lo cual concuerda con la reducción en la cantidad de NR2B en la sinapsis (Figura 19). El incremento en la concentración de microdominios en los ratones DV podría deberse a que el sistema compensa este decremento en la transmisión sináptica potenciando la señalización intracelular.

En sistema nervioso solo existe un trabajo en el que se observa un aumento en la concentración total microdominios lipídicos. El tratamiento con BDNF en cultivos neuronales por 3 días incrementa la concentración de colesterol y caveolina (marcardor de microdominios) específicamente en los microdominios lipídicos y no en el resto de la membrana. Este incremento fue bloqueado con inhibidores de la síntesis del colesterol. El tratamiento también produce un incremento de proteínas presinápticas específicamente en estos microdominios y de las enzimas que sintetizan el colesterol¹⁴⁴. De forma similar, es posible que la mutación de la valina de la subunidad NR2B del receptor NMDA cause un incremento en las enzimas que sintetizan el colesterol, lo cual será analizado en un futuro próximo.

Como se mencionó anteriormente, la mutación de la valina del dominio de unión a PDZ produjo una disminución de aproximadamente 40% la concentración de subunidad NR2B en los microdominios. Datos aun no publicados del laboratorio del Dr. Grant muestran que la supresión de esta valina, *in vitro*, elimina por completo la interacción del dominio PDZ de las proteínas de la familia MAGUK con la secuencia de unión PSV del receptor. Esto sugiere que la interacción con las proteínas de la familia MAGUK contribuye con la asociación del receptor con los

microdominios sin embargo, no es indispensable, pues la mayor parte del receptor NMDA que se asocia a los microdominios no se ve afectada por esta mutación.

Para estudiar si otras regiones del dominio carboxilo terminal están involucradas en la asociación del receptor con los microdominios, se analizó un mutante que carece del carboxilo terminal de la subunidad NR2A. La mutación del carboxilo terminal de la subunidad NR2B no es viable ¹⁴⁵. Los resultados obtenidos con estos ratones indican que otra región del carboxilo terminal también contribuye a la unión del receptor con los microdominios. La cinasa CAMKII forma agregados en los microdominios y puede reclutar a otras proteínas y hacer más estable el complejo ¹⁴⁶. El receptor NMDA interacciona con CAMKII a través de un dominio que se localiza también en el dominio carboxilo. La autofosforilación de CaMKII induce una unión de alta afinidad con la subunidad NR2B, esta unión depende del segmento que se localiza entre los residuos 1290-1309 de la cola carboxilo terminal así que una secuencia diferente al SPV ^{147, 148}. Esta interacción modula la plasticidad sináptica el aprendizaje espacial ¹⁴⁹. Como se muestra en la figura 19 la supresión del dominio carboxilo terminal disminuye en más de 60% la concentración de NR1 en los microdominios, mientras que la subunidad NR2B no se modifica. Debido a que la mayoría de anticuerpos que reconocen a la subunidad NR2A están hechos para reconocer el extremo carboxilo terminal, no fue posible encontrar un anticuerpo apropiado para identificar la subunidad NR2A sin carboxilo terminal. Sin embargo, debido a que la subunidad NR2B no cambia se puede concluir que la subunidad NR2A sin carboxilo terminal debe estar disminuida en los microdominios lipídicos. En el precipitado enriquecido en densidades postsinápticas se observa una disminución de la subunidad NR1 solo del 30%, similar a la que ocurre en los ratones NR2B que carecen de la valina terminal.

En conjunto, estos resultados indican que la asociación del receptor con los microdominios depende de la interacción de sus subunidades NR2 con otras proteínas mediante su carboxilo terminal sin una importante contribución de la subunidad NR1. Mientras que su asociación con la densidad postsináptica depende en menor medida de la subunidades NR2, ya que la concentración de la subunidad NR1 asociada a la densidad postsináptica se ve poco afectada por las mutaciones que afectan la región carboxilo terminal. Por lo tanto, es probablemente esta asociación dependa en mayor medida de la subunidad NR1. Existen dos trabajos publicados en donde se analizan ratones que carecen de la región carboxilo terminal de las subunidades NR2A, los resultados son controversiales. El grupo del doctor Kohr (2000) ha demostrado en experimentos una disminución mayor al 50% en extractos enriquecidos en densidades postsinápticas. Mientras que el grupo del doctor Seeburg en 1988 (estos ratones fueron los que analizamos en el presente trabajo) usando métodos electrofisiológicos concluye que la mutación del carboxilo terminal no afecta la localización del receptor en la densidad postsináptica ^{145, 150}. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que esta discrepancia se debe a que el grupo del doctor Kohr aisló las densidades postsinápticas basándose en su insolubilidad en tritón 1% por lo que este extracto estaba contaminado con microdominios lipídicos. Así que la diferencia encontrada se debe en gran parte a la disminución del receptor NMDA asociado con los microdominios y no con la densidad postsináptica.

Como se muestra en la tabla 1, las mutaciones que afectan la región carboxilo terminal de las subunidades del receptor o su interacción con las proteínas de la familia MAGUK afectan procesos de plasticidad sináptica (LTP, LTD) sin afectar la transmisión sináptica basal. Interesantemente, el grado en que

la mutación afecta la plasticidad sináptica se correlaciona con el efecto de la mutación en la concentración de receptor NMDA en los microdominios. La supresión de PSD-95 incrementa la concentración de receptor NMDA en los microdominios y también la inducción de LTP; la mutación de la valina de la subunidad NR2B disminuye alrededor de un 40% la concentración de receptor NMDA en los microdominios y aproximadamente 30% la LTP; mientras que la supresión del carboxilo terminal de la subunidad NR2B disminuye en aproximadamente un 60% la LTP y en más de 60% la concentración de receptor en los microdominios. Si tomamos en conjunto estos resultados con el efecto del entrenamiento en la fosforilación y en el reclutamiento del receptor NMDA hacia los microdominios, se puede concluir que el reclutamiento de receptores NMDA en los microdominios lipídicos es un mecanismo de importancia, que regula la funcionalidad del receptor y en particular regula procesos durante la inducción de plasticidad sináptica tales como la formación de la memoria espacial.

Proteína	Gen	Tipo de Mutación	Fondo genético	Transmisión sináptica basal	Estimulación con pulsos pareados	LTP (Estimulación τ)	LTP (Estimulación alta frecuencia)	Reportado en:
PSD-95 - / -	Dlg4	Delección homocigota de los dominios PDZ, Eliminación homocigota	C57BL/6J	35%	111%	214%		Migaud <i>et al</i> 1998 y Carlisle <i>et al</i> 2008
PSD-93 - / -	Dlg2	Eliminación homocigota	C57BL/6J	98%	110%	99%		Carlisle <i>et al</i> 2008
NR2B DV	Grin2b	Eliminación homocigota de la valina carboxilo terminal	C57BL/6J	100%	97%	73%		Aún no ha sido reportado
NR2A DC	Grin2a	Eliminación homocigota del dominios citoplasmico carboxilo terminal	C57BL/6J	107%	93%	43%	47%	Sprengel <i>et al</i> 1998

Tabla 1. Resumen del fenotipo electrofisiológico de los ratones mutantes, Maksym Kopanitsa, Nurudeen Afinowi, Seth Grant, 2007.

Bibliografía

1. Cull-Candy, S., Brickley, S. & Farrant, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 327-35 (2001).
2. van Zundert, B., Yoshii, A. & Constantine-Paton, M. Receptor compartmentalization and trafficking at glutamate synapses: a developmental proposal. *Trends Neurosci* **27**, 428-37 (2004).
3. Wenthold, R.J., Sans, N., Standley, S., Prybylowski, K. & Petralia, R.S. Early events in the trafficking of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *Biochem Soc Trans* **31**, 885-8 (2003).
4. Wenthold, R.J., Prybylowski, K., Standley, S., Sans, N. & Petralia, R.S. Trafficking of NMDA receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**, 335-58 (2003).
5. Zukin, R.S. & Bennett, M.V. Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci* **18**, 306-13 (1995).
6. Traynelis, S.F., Burgess, M.F., Zheng, F., Lyuboslavsky, P. & Powers, J.L. Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit. *J Neurosci* **18**, 6163-75 (1998).
7. Traynelis, S.F., Hartley, M. & Heinemann, S.F. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* **268**, 873-6 (1995).
8. Ishii, T. et al. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem* **268**, 2836-43 (1993).
9. Cull-Candy, S.G. & Leszkiewicz, D.N. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* **2004**, re16 (2004).
10. Kornau, H.C. & Seeburg, P.H. Partner selection by PDZ domains. *Nat Biotechnol* **15**, 319 (1997).
11. Kornau, H.C., Seeburg, P.H. & Kennedy, M.B. Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Curr Opin Neurobiol* **7**, 368-73 (1997).
12. Scannevin, R.H. & Haganir, R.L. Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci* **1**, 133-41 (2000).
13. Grosshans, D.R. & Browning, M.D. Protein kinase C activation induces tyrosine phosphorylation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor. *J Neurochem* **76**, 737-44 (2001).
14. Li, B.S. et al. Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12742-7 (2001).
15. Liao, G.Y., Wagner, D.A., Hsu, M.H. & Leonard, J.P. Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-D-aspartate receptor current. *Mol Pharmacol* **59**, 960-4 (2001).
16. Lu, W.Y. et al. G-protein-coupled receptors act via protein kinase C and Src to regulate NMDA receptors. *Nat Neurosci* **2**, 331-8 (1999).
17. Salter, D.M., Wright, M.O. & Millward-Sadler, S.J. NMDA receptor expression and roles in human articular chondrocyte mechanotransduction. *Biorheology* **41**, 273-81 (2004).
18. Moon, I.S., Apperson, M.L. & Kennedy, M.B. The major tyrosine-phosphorylated protein in the postsynaptic density fraction is N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3954-8 (1994).
19. Nakazawa, K. et al. Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* **297**, 211-8 (2002).
20. Nakazawa, T. et al. NR2B tyrosine phosphorylation modulates fear learning as well as amygdaloid synaptic plasticity. *Embo J* **25**, 2867-77 (2006).

21. Wu, H.Y. et al. Fyn-mediated phosphorylation of NR2B Tyr-1336 controls calpain-mediated NR2B cleavage in neurons and heterologous systems. *J Biol Chem* **282**, 20075-87 (2007).
22. Gautam, M. et al. Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* **377**, 232-6 (1995).
23. Pittenger, C. & Kandel, E.R. In search of general mechanisms for long-lasting plasticity: Aplysia and the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 757-63 (2003).
24. Shu, S.Y., Wu, Y.M., Bao, X.M. & Leonard, B. Interactions among memory-related centers in the brain. *J Neurosci Res* **71**, 609-16 (2003).
25. Squire, L.R. The organization and neural substrates of human memory. *Int J Neurol* **21-22**, 218-22 (1987).
26. Squire, L.R. & McKee, R.D. Declarative and nondeclarative memory in opposition: when prior events influence amnesic patients more than normal subjects. *Mem Cognit* **21**, 424-30 (1993).
27. Squire, L.R. & Zola, S.M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13515-22 (1996).
28. Goelet, P., Castellucci, V.F., Schacher, S. & Kandel, E.R. The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* **322**, 419-22 (1986).
29. Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D.H. & Hirokawa, N. Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* **288**, 1796-802 (2000).
30. Choquet, D. & Triller, A. The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat Rev Neurosci* **4**, 251-65 (2003).
31. Tovar, K.R. & Westbrook, G.L. Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* **34**, 255-64 (2002).
32. Hynd, M.R., Scott, H.L. & Dodd, P.R. Glutamate(NMDA) receptor NR1 subunit mRNA expression in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **78**, 175-82 (2001).
33. Scott, D.B., Blanpied, T.A., Swanson, G.T., Zhang, C. & Ehlers, M.D. An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J Neurosci* **21**, 3063-72 (2001).
34. Standley, S., Roche, K.W., McCallum, J., Sans, N. & Wenthold, R.J. PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* **28**, 887-98 (2000).
35. McIlhinney, R.A. et al. Assembly intracellular targeting and cell surface expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1a and NR2A in transfected cells. *Neuropharmacology* **37**, 1355-67 (1998).
36. Quinlan, E.M., Philpot, B.D., Haganir, R.L. & Bear, M.F. Rapid, experience-dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex in vivo. *Nat Neurosci* **2**, 352-7 (1999).
37. Chung, H.J., Huang, Y.H., Lau, L.F. & Haganir, R.L. Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J Neurosci* **24**, 10248-59 (2004).
38. Kim, E., Cho, K.O., Rothschild, A. & Sheng, M. Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron* **17**, 103-13 (1996).
39. Grosshans, D.R., Clayton, D.A., Coultrap, S.J. & Browning, M.D. LTP leads to rapid surface expression of NMDA but not AMPA receptors in adult rat CA1. *Nat Neurosci* **5**, 27-33 (2002).

40. Heynen, A.J., Quinlan, E.M., Bae, D.C. & Bear, M.F. Bidirectional, activity-dependent regulation of glutamate receptors in the adult hippocampus in vivo. *Neuron* **28**, 527-36 (2000).
41. Rao, A. & Craig, A.M. Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuron* **19**, 801-12 (1997).
42. Crump, F.T., Dillman, K.S. & Craig, A.M. cAMP-dependent protein kinase mediates activity-regulated synaptic targeting of NMDA receptors. *J Neurosci* **21**, 5079-88 (2001).
43. Auger, C. & Attwell, D. Fast removal of synaptic glutamate by postsynaptic transporters. *Neuron* **28**, 547-58 (2000).
44. Yoshii, A., Sheng, M.H. & Constantine-Paton, M. Eye opening induces a rapid dendritic localization of PSD-95 in central visual neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1334-9 (2003).
45. Townsend, M., Yoshii, A., Mishina, M. & Constantine-Paton, M. Developmental loss of miniature N-methyl-D-aspartate receptor currents in NR2A knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1340-5 (2003).
46. Philpot, B.D., Cho, K.K.A. & Bear, M.F. Obligatory Role of NR2A for Metaplasticity in Visual Cortex. *Neuron* **53**, 495-502 (2007).
47. Perez-Otano, I. & Ehlers, M.D. Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci* **28**, 229-38 (2005).
48. Nong, Y., Huang, Y.Q. & Salter, M.W. NMDA receptors are movin' in. *Curr Opin Neurobiol* **14**, 353-61 (2004).
49. Lavezzari, G., McCallum, J., Dewey, C.M. & Roche, K.W. Subunit-specific regulation of NMDA receptor endocytosis. *J Neurosci* **24**, 6383-91 (2004).
50. Lavezzari, G., McCallum, J., Lee, R. & Roche, K.W. Differential binding of the AP-2 adaptor complex and PSD-95 to the C-terminus of the NMDA receptor subunit NR2B regulates surface expression. *Neuropharmacology* **45**, 729-37 (2003).
51. Roche, K.W. et al. Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat Neurosci* **4**, 794-802 (2001).
52. Scott, D.B., Michailidis, I., Mu, Y., Logothetis, D. & Ehlers, M.D. Endocytosis and degradative sorting of NMDA receptors by conserved membrane-proximal signals. *J Neurosci* **24**, 7096-109 (2004).
53. Vissel, B., Krupp, J.J., Heinemann, S.F. & Westbrook, G.L. A use-dependent tyrosine dephosphorylation of NMDA receptors is independent of ion flux. *Nat Neurosci* **4**, 587-96 (2001).
54. Fong, D.K., Rao, A., Crump, F.T. & Craig, A.M. Rapid synaptic remodeling by protein kinase C: reciprocal translocation of NMDA receptors and calcium/calmodulin-dependent kinase II. *J Neurosci* **22**, 2153-64 (2002).
55. Groc, L. et al. Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* **7**, 695-6 (2004).
56. Edidin, M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 414-8 (2003).
57. Radeva, G. & Sharom, F.J. Isolation and characterization of lipid rafts with different properties from RBL-2H3 (rat basophilic leukaemia) cells. *Biochem J* **380**, 219-30 (2004).
58. Rodgers, W. & Smith, K. Properties of glycolipid-enriched membrane rafts in antigen presentation. *Crit Rev Immunol* **25**, 19-30 (2005).
59. Abulrob, A. et al. Protection by cholesterol-extracting cyclodextrins: a role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution. *J Neurochem* **92**, 1477-86 (2005).

60. Ma, L. et al. Ligand-dependent recruitment of the ErbB4 signaling complex into neuronal lipid rafts. *J Neurosci* **23**, 3164-75 (2003).
61. Suzuki, T. et al. Biochemical evidence for localization of AMPA-type glutamate receptor subunits in the dendritic raft. *Brain Res Mol Brain Res* **89**, 20-8 (2001).
62. Becher, A., White, J.H. & McIlhinney, R.A. The gamma-aminobutyric acid receptor B, but not the metabotropic glutamate receptor type-1, associates with lipid rafts in the rat cerebellum. *J Neurochem* **79**, 787-95 (2001).
63. Marta, C.B. et al. Antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein leads to its rapid repartitioning into detergent-insoluble fractions, and altered protein phosphorylation and cell morphology. *J Neurosci* **23**, 5461-71 (2003).
64. Rodriguez, R., Matsuda, M., Storey, A. & Katan, M. Requirements for distinct steps of phospholipase Cgamma2 regulation, membrane-raft-dependent targeting and subsequent enzyme activation in B-cell signalling. *Biochem J* **374**, 269-80 (2003).
65. Chung, J.B., Baumeister, M.A. & Monroe, J.G. Cutting edge: differential sequestration of plasma membrane-associated B cell antigen receptor in mature and immature B cells into glycosphingolipid-enriched domains. *J Immunol* **166**, 736-40 (2001).
66. Weintraub, B.C. et al. Entry of B cell receptor into signaling domains is inhibited in tolerant B cells. *J Exp Med* **191**, 1443-8 (2000).
67. Besshoh, S., Bawa, D., Teves, L., Wallace, M.C. & Gurd, J.W. Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. *J Neurochem* **93**, 186-94 (2005).
68. Guirland, C., Suzuki, S., Kojima, M., Lu, B. & Zheng, J.Q. Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron* **42**, 51-62 (2004).
69. Zhao, W.Q., Waisman, D.M. & Grimaldi, M. Specific localization of the annexin II heterotetramer in brain lipid raft fractions and its changes in spatial learning. *J Neurochem* **90**, 609-20 (2004).
70. Mukherjee, A., Arnaud, L. & Cooper, J.A. Lipid-dependent recruitment of neuronal Src to lipid rafts in the brain. *J Biol Chem* **278**, 40806-14 (2003).
71. Hering, H., Lin, C.C. & Sheng, M. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci* **23**, 3262-71 (2003).
72. Takebayashi, M., Hayashi, T. & Su, T.P. Sigma-1 receptors potentiate epidermal growth factor signaling towards neuritogenesis in PC12 cells: potential relation to lipid raft reconstitution. *Synapse* **53**, 90-103 (2004).
73. Yanagisawa, M., Nakamura, K. & Taga, T. Roles of lipid rafts in integrin-dependent adhesion and gp130 signalling pathway in mouse embryonic neural precursor cells. *Genes to Cells* **9**, 801-809 (2004).
74. Tooze, S., Seethaler, G. & Shields, D. The art of protein sorting: Meeting report from the Annaberg Meeting, Goldegg, Austria, 9-13 January 2001. *Traffic* **2**, 358-61 (2001).
75. Lee, S.J. et al. A detergent-insoluble membrane compartment contains A beta in vivo. *Nat Med* **4**, 730-4 (1998).
76. Bouilliot, C., Prochiantz, A., Rougon, G. & Allinquant, B. Axonal Amyloid Precursor Protein Expressed by Neurons in Vitro Is Present in a Membrane Fraction with Caveolae-like Properties. *J. Biol. Chem.* **271**, 7640-7644 (1996).
77. Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C. & Simons, K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer {beta}-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* **160**, 113-123 (2003).

78. Vetrivel, K.S. et al. Association of γ -Secretase with Lipid Rafts in Post-Golgi and Endosome Membranes. *J. Biol. Chem.* **279**, 44945-44954 (2004).
79. Baron, H. Research strategies for evaluation of prion partitioning in plasma fractionation: impact of different forms of prion spike on partitioning behaviour. *Dev Biol (Basel)* **108**, 99-109 (2002).
80. Brugger, B. et al. The Membrane Domains Occupied by Glycosylphosphatidylinositol-anchored Prion Protein and Thy-1 Differ in Lipid Composition. *J. Biol. Chem.* **279**, 7530-7536 (2004).
81. Sanghera, N. & Pinheiro, T.J. Binding of prion protein to lipid membranes and implications for prion conversion. *J Mol Biol* **315**, 1241-56 (2002).
82. Bruckner, K. et al. EphrinB ligands recruit GRIP family PDZ adaptor proteins into raft membrane microdomains. *Neuron* **22**, 511-24 (1999).
83. Davy, A. et al. Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Dev.* **13**, 3125-3135 (1999).
84. Palmer, A. et al. EphrinB Phosphorylation and Reverse Signaling: Regulation by Src Kinases and PTP-BL Phosphatase. *Molecular Cell* **9**, 725-737 (2002).
85. Delling, M. et al. The Neural Cell Adhesion Molecule Regulates Cell-Surface Delivery of G-Protein-Activated Inwardly Rectifying Potassium Channels Via Lipid Rafts. *J. Neurosci.* **22**, 7154-7164 (2002).
86. Niethammer, P. et al. Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *J. Cell Biol.* **157**, 521-532 (2002).
87. Herincs, Z. et al. DCC association with lipid rafts is required for netrin-1-mediated axon guidance. *J Cell Sci* **118**, 1687-1692 (2005).
88. Tansey, M.G., Baloh, R.H., Milbrandt, J. & Johnson, J., Eugene M. GFR[alpha]-Mediated Localization of RET to Lipid Rafts Is Required for Effective Downstream Signaling, Differentiation, and Neuronal Survival. *Neuron* **25**, 611-623 (2000).
89. Pierchala, B.A., Milbrandt, J. & Johnson, E.M., Jr. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor-Dependent Recruitment of Ret into Lipid Rafts Enhances Signaling by Partitioning Ret from Proteasome-Dependent Degradation. *J. Neurosci.* **26**, 2777-2787 (2006).
90. Swaminathan, G. & Tsygankov, A.Y. The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling. *J Cell Physiol* **209**, 21-43 (2006).
91. Gelman, I.H. Pyk 2 FAKs, any two FAKs. *Cell Biol Int* **27**, 507-10 (2003).
92. Mitsuda, T. et al. Overexpression of Ganglioside GM1 Results in the Dispersion of Platelet-derived Growth Factor Receptor from Glycolipid-enriched Microdomains and in the Suppression of Cell Growth Signals. *J. Biol. Chem.* **277**, 11239-11246 (2002).
93. Nishio, M. et al. Overexpressed GM1 suppresses nerve growth factor (NGF) signals by modulating the intracellular localization of NGF receptors and membrane fluidity in PC12 cells. *J Biol Chem* **279**, 33368-78 (2004).
94. Kasai, A., Shima, T. & Okada, M. Role of Src family tyrosine kinases in the down-regulation of epidermal growth factor signaling in PC12 cells. *Genes to Cells* **10**, 1175-1187 (2005).
95. Asaki, C., Usuda, N., Nakazawa, A., Kametani, K. & Suzuki, T. Localization of translational components at the ultramicroscopic level at postsynaptic sites of the rat brain. *Brain Research* **972**, 168-176 (2003).
96. Pike, L.J. The challenge of lipid rafts. *J Lipid Res* (2008).
97. Pike, L.J. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* **378**, 281-92 (2004).
98. Foger, N., Marhaba, R. & Zoller, M. Involvement of CD44 in cytoskeleton rearrangement and raft reorganization in T cells. *J Cell Sci* **114**, 1169-78 (2001).

99. Yamazaki, M. et al. Differential palmitoylation of two mouse glutamate receptor interacting protein 1 forms with different N-terminal sequences. *Neurosci Lett* **304**, 81-4 (2001).
100. Topinka, J.R. & Brecht, D.S. N-terminal palmitoylation of PSD-95 regulates association with cell membranes and interaction with K⁺ channel Kv1.4. *Neuron* **20**, 125-34 (1998).
101. Dalskov, S.-M. et al. Lipid raft localization of GABAA receptor and Na⁺, K⁺-ATPase in discrete microdomain clusters in rat cerebellar granule cells. *Neurochemistry International* **46**, 489-499 (2005).
102. Bruses, J.L., Chauvet, N. & Rutishauser, U. Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the (alpha)7 nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. *J Neurosci* **21**, 504-12 (2001).
103. Morris, R.G.M., Anderson, E., Lynch, G.S. & Baudry, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. **319**, 774-776 (1986).
104. Eichenbaum, H., Stewart, C. & Morris, R. Hippocampal representation in place learning. *J. Neurosci.* **10**, 3531-3542 (1990).
105. Davis, S., Butcher, S. & Morris, R. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J. Neurosci.* **12**, 21-34 (1992).
106. Izquierdo, L.A. et al. Novelty enhances retrieval: molecular mechanisms involved in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **13**, 1464-7 (2001).
107. Morris, R. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D- aspartate receptor antagonist AP5. *J. Neurosci.* **9**, 3040-3057 (1989).
108. Tang, Y.P. et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* **401**, 63-9 (1999).
109. Adams, M.M. et al. Hippocampal dependent learning ability correlates with N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor levels in CA3 neurons of young and aged rats. *J Comp Neurol* **432**, 230-43 (2001).
110. Gutierrez, H., Hernandez-Echeagaray, E., Ramirez-Amaya, V. & Bermudez-Rattoni, F. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience* **89**, 751-8 (1999).
111. Krushel, L.A. & van der Kooy, D. Visceral cortex: integration of the mucosal senses with limbic information in the rat agranular insular cortex. *J Comp Neurol* **270**, 39-54, 62-3 (1988).
112. Bermudez-Rattoni, F., Introini-Collison, I.B. & McGaugh, J.L. Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5379-82 (1991).
113. Escobar, M.L., Alcocer, I. & Bermudez-Rattoni, F. In vivo effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion. *Behav Brain Res* **129**, 101-6 (2002).
114. Escobar, M.L., Alcocer, I. & Chao, V. The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo. *Brain Res* **812**, 246-51 (1998).
115. Mizuno, M., Yamada, K., He, J., Nakajima, A. & Nabeshima, T. Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation. *Learn Mem* **10**, 108-15 (2003).

116. Carlin, R.K., Grab, D.J., Cohen, R.S. & Siekevitz, P. Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J Cell Biol* **86**, 831-45 (1980).
117. Cohen, R.S., Blomberg, F., Berzins, K. & Siekevitz, P. The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex. I. Overall morphology and protein composition. *J Cell Biol* **74**, 181-203 (1977).
118. Migaud, M. et al. Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* **396**, 433-9 (1998).
119. Schluter, O.M., Xu, W. & Malenka, R.C. Alternative N-terminal domains of PSD-95 and SAP97 govern activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor function. *Neuron* **51**, 99-111 (2006).
120. Rong, Y., Lu, X., Bernard, A., Khrestchatsky, M. & Baudry, M. Tyrosine phosphorylation of ionotropic glutamate receptors by Fyn or Src differentially modulates their susceptibility to calpain and enhances their binding to spectrin and PSD-95. *J Neurochem* **79**, 382-90 (2001).
121. Kohr, G. & Seeburg, P.H. Subtype-specific regulation of recombinant NMDA receptor-channels by protein tyrosine kinases of the src family. *J Physiol* **492** (Pt 2), 445-52 (1996).
122. Liu, L. et al. Role of NMDA Receptor Subtypes in Governing the Direction of Hippocampal Synaptic Plasticity. *Science* **304**, 1021-1024 (2004).
123. Bartlett, T.E. et al. Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus. *Neuropharmacology LTP: Forty Unforgettable Years. A Festschrift in Honour of Professor Tim Bliss FRS* **52**, 60-70 (2007).
124. Berberich, S. et al. Lack of NMDA Receptor Subtype Selectivity for Hippocampal Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* **25**, 6907-6910 (2005).
125. Clayton, D.A., Mesches, M.H., Alvarez, E., Bickford, P.C. & Browning, M.D. A Hippocampal NR2B Deficit Can Mimic Age-Related Changes in Long-Term Potentiation and Spatial Learning in the Fischer 344 Rat. *J. Neurosci.* **22**, 3628-3637 (2002).
126. Zhao, M.-G. et al. Roles of NMDA NR2B Subtype Receptor in Prefrontal Long-Term Potentiation and Contextual Fear Memory. *Neuron* **47**, 859-872 (2005).
127. Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B. & Seeburg, P.H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **12**, 529-40 (1994).
128. Ritter, L.M., Vazquez, D.M. & Meador-Woodruff, J.H. Ontogeny of ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* **139**, 227-36 (2002).
129. Sheng, M., Cummings, J., Roldan, L.A., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* **368**, 144-7 (1994).
130. Massey, P.V. et al. Differential Roles of NR2A and NR2B-Containing NMDA Receptors in Cortical Long-Term Potentiation and Long-Term Depression. *J. Neurosci.* **24**, 7821-7828 (2004).
131. Lingwood, D. & Simons, K. Detergent resistance as a tool in membrane research. *Nat Protoc* **2**, 2159-65 (2007).
132. Melkonian, K.A., Ostermeyer, A.G., Chen, J.Z., Roth, M.G. & Brown, D.A. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem* **274**, 3910-7 (1999).

133. Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C. & Tsien, R.Y. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**, 913-6 (2002).
134. Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B. & Seeburg, P.H. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* **269**, 1737-40 (1995).
135. Stetzkowski-Marden, F. et al. Rafts are required for acetylcholine receptor clustering. *J Mol Neurosci* **30**, 37-8 (2006).
136. Campagna, J.A. & Fallon, J. Lipid rafts are involved in C95 (4,8) agrin fragment-induced acetylcholine receptor clustering. *Neuroscience* **138**, 123-132 (2006).
137. Marchand, S., Bignami, F., Stetzkowski-Marden, F. & Cartaud, J. The myristoylated protein rapsyn is cotargeted with the nicotinic acetylcholine receptor to the postsynaptic membrane via the exocytic pathway. *J Neurosci* **20**, 521-8 (2000).
138. Zhu, D., Xiong, W.C. & Mei, L. Lipid Rafts Serve as a Signaling Platform for Nicotinic Acetylcholine Receptor Clustering. *J. Neurosci.* **26**, 4841-4851 (2006).
139. Carlisle, H.J., Fink, A.E., Grant, S.G. & O'Dell, T.J. Opposing effects of PSD-93 and PSD-95 on long-term potentiation and spike timing-dependent plasticity. *J Physiol* **586**, 5885-900 (2008).
140. McGee, A.W. et al. PSD-93 knock-out mice reveal that neuronal MAGUKs are not required for development or function of parallel fiber synapses in cerebellum. *J Neurosci* **21**, 3085-91 (2001).
141. Funke, L., Dakoji, S. & Bredt, D.S. Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu Rev Biochem* **74**, 219-45 (2005).
142. El-Husseini, A.E. et al. Dual palmitoylation of PSD-95 mediates its vesiculotubular sorting, postsynaptic targeting, and ion channel clustering. *J Cell Biol* **148**, 159-72 (2000).
143. El-Husseini, A.E. et al. Ion channel clustering by membrane-associated guanylate kinases. Differential regulation by N-terminal lipid and metal binding motifs. *J Biol Chem* **275**, 23904-10 (2000).
144. Suzuki, S. et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates cholesterol metabolism for synapse development. *J Neurosci* **27**, 6417-27 (2007).
145. Sprengel, R. et al. Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell* **92**, 279-89 (1998).
146. Suzuki, T., Du, F., Tian, Q.B., Zhang, J. & Endo, S. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II clusters are associated with stable lipid rafts and their formation traps PSD-95. *J Neurochem* **104**, 596-610 (2008).
147. Strack, S., Robison, A.J., Bass, M.A. & Colbran, R.J. Association of calcium/calmodulin-dependent kinase II with developmentally regulated splice variants of the postsynaptic density protein densin-180. *J Biol Chem* **275**, 25061-4 (2000).
148. Strack, S., McNeill, R.B. & Colbran, R.J. Mechanism and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II targeting to the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* **275**, 23798-806 (2000).
149. Zhou, Y. et al. Interactions between the NR2B receptor and CaMKII modulate synaptic plasticity and spatial learning. *J Neurosci* **27**, 13843-53 (2007).
150. Steigerwald, F. et al. C-Terminal truncation of NR2A subunits impairs synaptic but not extrasynaptic localization of NMDA receptors. *J Neurosci* **20**, 4573-81 (2000).

Spatial memory formation induces recruitment of NMDA receptor and PSD-95 to synaptic lipid rafts

Ilse Delint-Ramírez, Pamela Salcedo-Tello and Federico Bermudez-Rattoni

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

Abstract

NMDA receptors (NMDARs) activation in the hippocampus and insular cortex is necessary for spatial memory formation. Recent studies suggest that localization of NMDARs to lipid rafts enhance their signalization, since the kinases that phosphorylate its subunits are present in larger proportion in lipid raft membrane microdomains. We sought to determine the possibility that NMDAR translocation to synaptic lipid rafts occurs during plasticity processes such as memory formation. Our results show that water maze training induces a rapid recruitment of NMDAR subunits (NR1, NR2A, NR2B) and PSD-95 to synaptic lipid rafts and decrease in the post-synaptic density plus an increase of NR2B phosphorylation at

tyrosine 1472 in the rat insular cortex. In the hippocampus, spatial training induces selective translocation of NR1 and NR2A subunits to lipid rafts. These results suggest that NMDARs translocate from the soluble fraction of post-synaptic membrane (non-raft PSD) to synaptic lipid raft during spatial memory formation. The recruitment of NMDA receptors and other proteins to lipid rafts could be an important mechanism for increasing the efficiency of synaptic transmission during synaptic plasticity process.

Keywords: lipid raft, memory, NMDA receptor, plasticity, post-synaptic density, trafficking.

J. Neurochem. (2008) **106**, 1658–1668.

NMDA receptors (NMDARs) are a very important trigger for synaptic plasticity (Harris *et al.* 1984; Morris *et al.* 1986; Morris 1989; Philpot *et al.* 2007). Trafficking of NMDA receptors is an important mechanism of NMDAR regulation (Quinlan *et al.* 1999; Heynen *et al.* 2000; Grosshans and Browning 2001; Fong *et al.* 2002; Malinow and Malenka 2002; Tovar and Westbrook 2002; Townsend *et al.* 2003; Groc *et al.* 2004). Recent findings suggest that trafficking to lipid rafts microdomains regulate the NMDARs function (Abulrob *et al.* 2005; Besshoh *et al.* 2005).

Lipid rafts are membrane regions enriched in cholesterol, sphingolipids, glycosphingolipids and acylated proteins. The rafts play an important role in signal transduction, trafficking and sorting of membrane proteins (Suzuki *et al.* 2001; Radeva and Sharom 2004). Rafts are associated with several post-synaptic proteins including NMDA, α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate, and acetylcholine receptors, PSD-95 and kinases known to phosphorylate NMDAR (Becher *et al.* 2001; Suzuki *et al.* 2001; Ma *et al.* 2003; Guirland *et al.* 2004; Besshoh *et al.* 2005). Furthermore, large regions of the post-synaptic density (PSD) are associated with lipid rafts (Ma *et al.* 2003; Mukherjee *et al.* 2003; Abulrob *et al.* 2005; Besshoh *et al.* 2005). Besshoh and collaborators demonstrated that ischemia induced an increase of NMDARs

in PSD associated with soluble membrane, a reduction of receptors in synaptic lipid rafts and a higher increase in tyrosine phosphorylation of NR2 subunits in raft fraction compared with the PSD (Besshoh *et al.* 2005). Another study demonstrated that disruption of lipid rafts induced neuroprotection against NMDA- or glutamate-induced excitotoxicity in cortical cultures (Abulrob *et al.* 2005). This data suggests that the localization of NMDAR inside lipid rafts could increase the efficiency of signal transduction induced by NMDAR activation. Therefore, activity-dependent NMDAR translocation to lipid rafts could be a mechanism of synaptic potentiation during the plasticity process, such as spatial memory formation.

Received April 30, 2008; revised manuscript received June 5, 2008; accepted June 6, 2008.

Address correspondence and reprint requests to Federico Bermudez-Rattoni, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-253 México D.F., 04510, México. E-mail: fbermude@ifc.unam.mx

Abbreviations used: GM1, monosialoganglioside; IC, insular cortex; nAChR, nicotinic acetylcholine receptor; LTP, long term potentiation; NMDAR, NMDA receptor; PSD, post-synaptic density; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

Morris water maze has been widely used to test the mechanisms related to spatial memory formation (Morris *et al.* 1986; Eichenbaum *et al.* 1990; Davis *et al.* 1992). Insular cortex (IC) and hippocampus are involved in acquisition and consolidation of water maze task. In this regard, pre- or post-trial injections of NMDAR antagonist in both regions disrupt spatial memory consolidation (Morris *et al.* 1986; Morris 1989; Davis *et al.* 1992; Gutierrez *et al.* 1999). Similarly, human hippocampus and IC increase their activity during spatial-related tasks (Shallice *et al.* 1994; King *et al.* 2002; Bohbot *et al.* 2004).

Therefore, in order to study the possible recruitment of NMDAR to lipid rafts during synaptic plasticity, we analyzed the amount of NMDAR subunits in lipid rafts isolated from IC. We found that water maze training induces an increase of NMDAR subunits in lipid rafts, whereas these subunits are decreased in the post-synaptic densities. We also analyzed the recruitment of NMDARs to lipid rafts in the hippocampus, and our results show that spatial training induces recruitment only of NR1 and NR2A subunits, which suggests a differential regulation of NMDAR subunits among brain regions, during spatial memory formation.

Materials and methods

Water maze training

Male Wistar rats from 260 to 300 g were trained in the Morris Water Maze (Harris *et al.* 1984; Morris *et al.* 1986; Morris 1989; Philpot *et al.* 2007). Animals were trained 10 trials in a water tank with a submerged platform located in a fixed position as previously reported (Ramirez-Amaya *et al.* 1999; Aguilar-Valles *et al.* 2007). On each trial, the animal was introduced from one of the 10 different points into a circular black pool located in a room with dim light (water temperature: 19–20°C). Animals from the trained group (T) were allowed to swim until reaching the invisible 10 cm × 10 cm platform, or manually led to it if the animal failed to find the platform within 60 s; they remained 30 s on the platform and 30 s in a dry cage. Swimming behavior and the time to achieve the platform, on each trial, was recorded. Animals of the swimming control group (C) were immersed 10 times into the tank with no platform or spatial cues, and were allowed to swim the average time registered for the trained group. The animals were decapitated immediately after the last trial with a guillotine in an adjacent room to that containing the tank and a sample of both insular cortices were dissected on ice. The area was cleaned between each sacrifice and bodies removed. We used independent groups of animals for each experiment. Two additional groups trained ($n = 9$) and swimming control rats ($n = 5$), were tested 24 h after training to show memory retention.

Isolation of lipid raft from homogenate tissue (whole cell lipid rafts)

Lipid rafts were prepared from insoluble fraction of homogenate tissue, as described previously by Marta and collaborators (Marta *et al.* 2003) with some modifications. Insular cortices from both

hemispheres of two rats per sample were mixed and homogenized in buffer (0.5 mL of 150 mM NaCl, 25 mM Tris-Cl buffer, pH 7.5, containing 50 mM NaF, 10 mM NaP₂O₇, 1 mM Sodium orthovanadate, complete protease inhibitors cocktail (Roche, Mannheim, Germany) and 1% Triton X-100. Protein concentration was determined by Lowry assay. Triton X-100 extracts (1.5 to 2.5 mg of protein) were incubated for 30 min at 4°C and centrifuged (13 000 g, 4°C, 10 min.) to separate the detergent-insoluble pellet. TX-100-insoluble pellet was resuspended in 0.5 mL of lysis buffer mixed with 2 M sucrose (1 mL), overlaid with 1 M (2 mL) and 0.2 M (1.5 mL) sucrose, and centrifuged for 18 h at 200 000 g (SW 60 Ti; Beckman) at 4°C. After centrifugation, 1 mL fractions were collected at 4°C from the top to the bottom of the gradient. Equal volumes of each fraction were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblot for the indicated proteins.

Preparation of synaptosomal fractions, synaptic lipid rafts and post-synaptic densities

Synaptic lipid rafts and post-synaptic densities were isolated from synaptosomal fraction as described earlier (Besshoh *et al.* 2005) with some modifications. Synaptosomal fraction was prepared from the mixed insular cortices of three animals per sample. Insular cortices were rapidly removed and homogenized in 1 mL of ice-cold solution A (0.32 M sucrose, 0.5 mM CaCl₂, 1 mM each of NaHCO₃, MgCl₂ and NaF, 2 mM sodium orthovanadate, 20 mM of glycerol 2-phosphate, complete protease inhibitors cocktail, Roche). Twelve up and down strokes performed homogenization with a Teflon glass homogenizer. The sample was centrifuged at 1000 g for 5 min, the pellet was washed with 0.5 mL of solution A and centrifuged again at 1000 g for 5 min. The supernatants were mixed and centrifuged at 15 000 g for 15 min. The resulting pellet was suspended in solution B (solution A without CaCl₂ and MgCl₂), loaded on the top of a discontinuous sucrose gradient (equal volumes of 0.85, 1.0 and 1.2 M sucrose, each prepared in solution B) and centrifuged at 82 500 g for 2 h. The band sedimenting between 1.0 and 1.2 M sucrose (synaptosomes) was collected. Protein concentration was determined by Lowry assay. Equal protein concentration of synaptosomal fraction (400–600 µg) was diluted with solution C (solution B minus sucrose and NaHCO₃). Synaptosomes were pelleted by centrifugation at 40 000 g for 30 min and resuspended in 40% (w/v) sucrose in solution C and Triton X-100 was added to give a final detergent concentration of 0.5% (w/v) in 1.5 mL of sample. The suspension was incubated for 30 min at 4°C and was placed beneath a discontinuous sucrose gradient [2 mL of 30% (w/v) and 1.5 mL of 5% (w/v) sucrose prepared in solution C] and centrifuged at 200 000 g for 18 h. Following centrifugation, 1 mL samples were collected from the top of the gradient (0.5 mL samples were collected where it is indicated); and the pellet, termed post-synaptic densities, was resuspended in 1 mL of solution C. Equal volumes of each fraction were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies.

Immunoblot analysis

To analyze the total amount of proteins, both insular cortices of each rat (one rat per sample) were homogenized using sonication in ice-cold lysis buffer pH 7.5 containing 50 mM Tris-HCl,

150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% SDS, 10 mM Na₃VO₄, 25 mM sodium fluoride and complete protease inhibitors (Roche). Protein concentrations were determined by Lowry assay and 20 µg samples were mixed with Laemmli buffer to reach a final volume of 30 µL and then boiled for 3 min and subjected to vertical slab 7.5% SDS-PAGE. Electrophoresis was carried out at 110 V for 1.5 h. Proteins were electrophoretically transferred to Immobilon-P membrane (Bio-Rad) at 25 V for 50 min. The transfer buffer consisted of 2 mM Tris-HCl, 39 mM glycine, 0.1% SDS and 20% (vol/vol) methanol. The membrane was then incubated overnight at 4°C in Tris-buffered saline (TBS)-T (Tris 10 mM, NaCl 0.9%, Tween 20 0.1%, pH 7.5) containing 5% bovine serum albumin. For NMDAR subunits, polyvinylidene difluoride membranes were incubated for 24 h at 4°C with: goat polyclonal antibody anti NR2A and NR2B subunits (1 : 500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA, Catalog number sc-1467, sc-1468 and sc-1469, respectively), Sheep polyclonal anti PSD-95 (1 : 1000; Zymed, CA, USA, catalog number 51-6700), Mouse monoclonal anti Flotillin-1 (1 : 1000; BD Biosciences, Catalog number 610821). The membrane was washed (four times/5 min) in TBS-T, and incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody [Goat anti mouse IgG (Zimed) Catalog number 626620; donkey anti sheep IgG (Sigma, St Louis, MO, USA) Catalog number A3415; and donkey anti goat (Chemicon International)]. Membranes were washed (four times/10 min) in TBS-T, incubated with chemiluminescence's reagent (Immobilon™ Wester, Millipore, Billerica, USA) and exposed to X-ray film. Result films were scanned and levels of immunoreactivity were quantified densitometrically with the 1.31V ImageJ software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Negative controls were prepared by omission of primary antibodies.

Immunoprecipitation

The insular cortices of rats from trained and swimming control groups (one animal per sample) were extracted and homogenized in ice-cold lysis buffer pH 7.5 containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% SDS, 10 mM sodium orthovanadate, 25 mM sodium fluoride and protease inhibitors cocktail. All procedures were made at 4°C. Samples were centrifuged at 1500 g for 5 min. The supernatants were collected and protein concentrations determined by the Lowry assay. Equal amounts of protein (1000 µg) and 10 µL of polyclonal antibody were then used for NR2B immunoprecipitation overnight. Samples were incubated with protein G-Agarose beads (Roche) for 2 h at 4°C and the immune complexes were isolated by centrifugation at 1500 g during 2 min. The pellets were washed twice with lysis buffer and centrifuged at 1500 g during 2 min. The pellet was washed twice with buffer 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, (0.1% Nonidet P40, pH 7.5) and one more time with buffer 50 mM Tris-HCl pH 7.5. Samples were centrifuged at 12 000 g during 3 min and the pellets were re-suspended in 20 µL of laemmli buffer. The bound proteins were eluted by boiling during 5 min and centrifuged during three min at 2000 g. After centrifugation, 25 µL of the sample were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies. The membranes were incubated with NR2B phosphotyrosine 1472 monoclonal antibody (1 : 1000) (Cat. M2442, Sigma) during 24 h at 4°C. They were washed (four times/5 min) in TBS-T,

and incubated for 1 h with anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antibody (1 : 3000; Santa Cruz Biotechnology). After the membrane was revealed by chemiluminescence, it was incubated with stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM 2-mercapto-ethanol, 2% SDS) two times/20 min at 70°C and washed (five times/5 min) in TBS-T, then it was incubated with anti NR2B antibody (1 : 500; Santa Cruz Biotechnology). Densitometric analysis of phosphotyrosine 1472 was corrected in relation to NR2B content. No signal was detected when NR2B antibody was omitted during immunoprecipitation.

Dot-blot

To determine expression levels of the monosialoganglioside (GM1) in each fraction, 1 µL of each density gradient fraction were dot blotted on nitrocellulose, and blocked as described above. After incubation with horseradish peroxidase-conjugated cholera toxin B (Sigma), diluted 1 : 10 000 the dots were revealed by chemiluminescence.

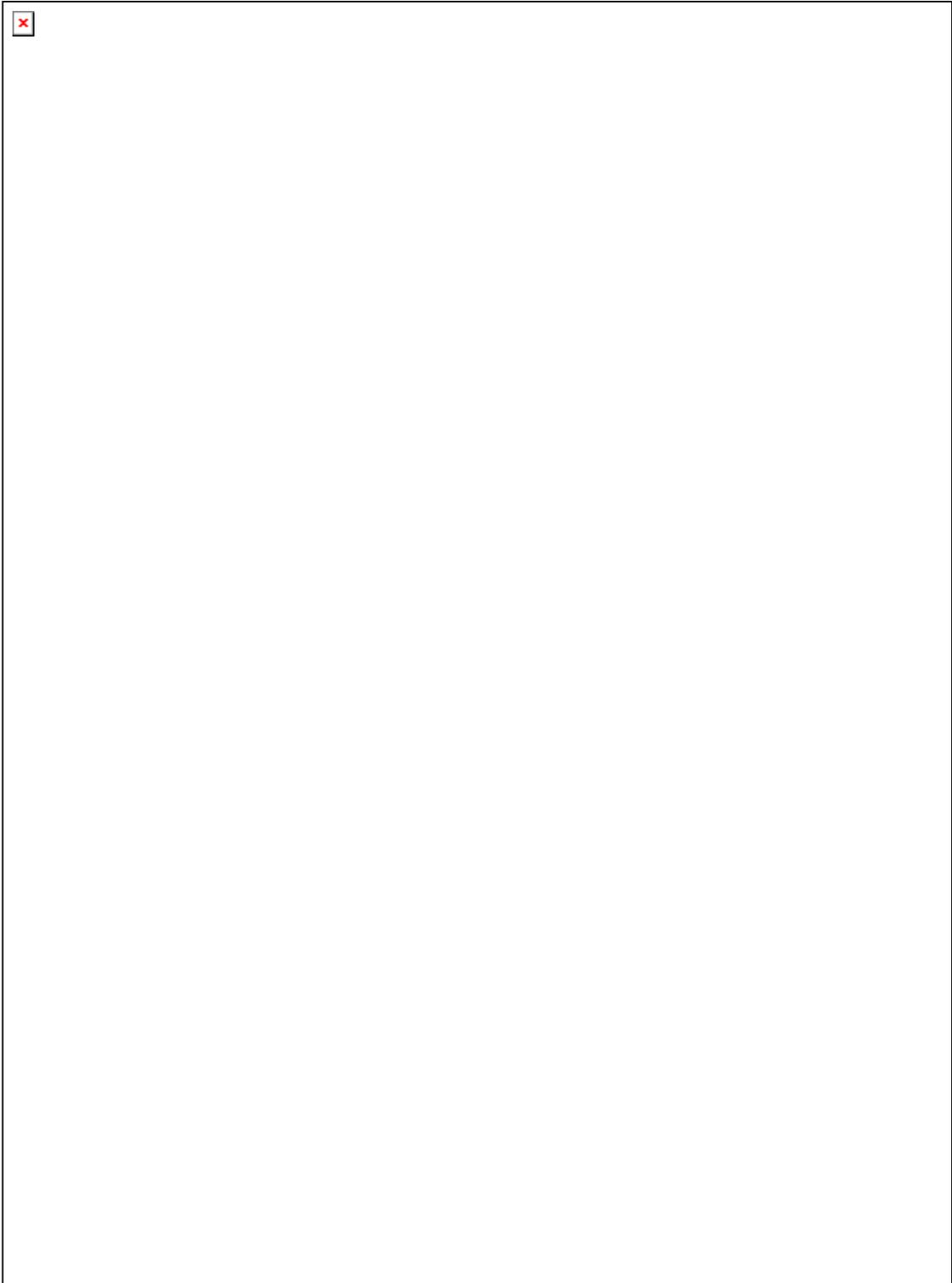
Statistical analysis

Each data represents an independent group of animals. Independent experiments were replicated a minimum of four times; each replica involved mixed tissues of various animals ($n \geq 4$). The statistical analysis took into account the number of replicas, not the number of animals used. Statistical differences between trained and control group were evaluated using the unpaired Student's t-test. Comparison between multiple groups was by ANOVA with *post-hoc* analysis by Fisher's protected least significant difference test. All results are expressed as the mean \pm SEM.

Results

Recruitment of NMDAR to lipid rafts in insular cortex during spatial training

Rafts are typically isolated as a low-density and detergent-resistant fraction after density gradient centrifugation (Simons *et al.* 1998). To determine if spatial training induces changes in association of NMDARs with lipid rafts microdomains, we isolated whole cell lipid rafts from homogenized insular cortex, based on their insolubility in Triton X-100 at 4°C (Brown 2006) and their ability to float in density gradients as described previously (Marta *et al.* 2003). Samples of the fractions obtained from sucrose gradients were analyzed by Western blot to locate the presence of lipid rafts markers flotillin-1 and monosialoganglioside (GM1) (dot-blot assay using cholera-toxin subunit B). We also blotted PSD95, NR2A and NR2B subunits which have been reported to reside in the lipid raft fraction (Hering *et al.* 2003; Marta *et al.* 2003). GM1 was greatly enriched in sucrose gradients, whereas low levels were detected in the other fractions. Similar to sphingolipids, Flotillin-1 showed higher enrichment in fraction 2 (Fig. 1a). As previously reported, PSD-95, NR2B and NR2A subunits of NMDAR were also present in the light fractions. (Hering *et al.* 2003).



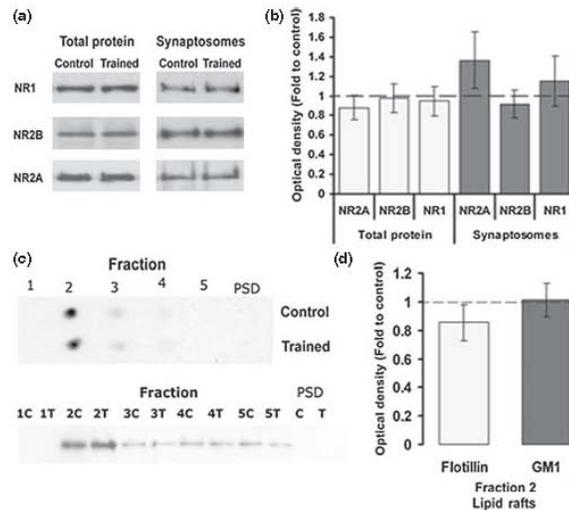


Fig. 2 Spatial training does not change NMDAR content in synaptosomal fraction nor concentration of synaptic lipid raft markers in insular cortex. (a) Representative NR2A, NR2B and NR1 immunoblot of 3 µg synaptosomal protein (three rats per sample for each independent experiment) and 10 µg total extract (one rat per sample). (b) Densitometric analysis from blots (a) expressed as the ratio of immunoreactivity in trained versus swimming control animals. Results are expressed as the mean ± SEM for four independent experiments. No difference was observed between trained and swimming conditions.

(c) Sucrose gradients were analyzed by immunoblot for flotillin-1 and dot blot for GM1 to identify synaptic lipid rafts fraction and compare flotillin-1 and GM1 content in lipid rafts fraction between trained and control animals (three rats per sample for each experiment). Equal volumes of each gradient fraction were analyzed. (d) Densitometric analysis from fraction 2 of blots showed in (c) expressed as the ratio (trained versus swimming control animals) of immunoreactivity mean ± SEM for four independent experiments.

increase of NMDAR subunits in lipid raft membrane indicates the insertion of receptors to the synaptic membrane or a lateral mobility to lipid raft membrane, we isolated synaptosomes of the insular cortex and evaluated NR1, NR2A, and NR2B subunit level in synaptosomes, as well as in the total extract of insular cortex. There were no significant changes in the amount of synaptosomal or total NMDARs subunits between trained and swimming control rats (Fig. 2a and b).

Redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities during training

We isolated synaptic lipid rafts and post-synaptic densities from the synaptosomal fraction of trained and control rats, incubated with 1% Triton X-100 on sucrose gradients. Five fractions from the top to the bottom of the gradient and the pellet (postsynaptic densities) were analyzed to locate the presence of flotillin-1 and GM1 and identify fractions enriched in lipid rafts. To assess training effects on the properties and recovery of lipid rafts, we analyzed fraction 2 of trained and

control rats. Based on the distribution of flotillin-1 and GM1, spatial training did not change the concentration of synaptic lipid rafts (fraction 2) (Fig. 2c and d).

Then we analyzed the distribution of NR1, NR2A and NR2B in the density gradient in trained and control rats. We found a significant increase of NR1, NR2A and NR2B subunits in synaptic lipid rafts (fraction 2) of the trained when compared with the control animals, whereas we found a significant decrease in post-synaptic densities (pellet) of the trained rats (Fig. 3). We also compared the amount of PSD-95 between trained and control rats in post-synaptic density, synaptic lipid rafts and synaptosomes. Like the NMDAR, PSD-95 was also increased in lipid raft fraction and decreased in post-synaptic density, whereas there were no changes in synaptosomes (Fig. 4a and b).

Postsynaptic density-95 and NMDA subunits were highly concentrated in the PSD fraction with respect to lipid raft fraction, the exposures of the radiographic film to analyze PSD fraction were very short as compared to the exposition to analyze lipid rafts fraction (1 and 20 min respectively).





therefore, we investigated the possibility that NMDAR translocation to synaptic lipid rafts plays a role in synaptic plasticity processes such as memory formation.

Our results show that in the IC, training in the water maze induces translocation of NR1, NR2A and NR2B subunits to lipid rafts. This training does not change subunit expression, nor affects overall lipid raft recovery, as reflected by synaptic lipid raft content of GM1 and flotillin-1. The insertion of NMDARs to the synaptic membrane during plasticity processes has been reported (Quinlan *et al.* 1999; Grosshans and Browning 2001). Grosshans and collaborators showed a substantial pool of intracellular NMDAR available for recruitment to the synaptic membrane, this intracellular pool was isolated outside synaptosomes. Thirty minutes after LTP stimulation, they observed a significant decrease of NR2A, NR1 and NR2B in the intracellular pools and increase in the synaptosomal membranes (Grosshans and Browning 2001). In our model (only one day of training), we did not find any increase of NMDAR in synaptosomal fraction, therefore there was no increase in the NMDAR insertion to synaptic membrane, nevertheless we observed an increase of NMDARs in the lipid rafts and decrease in PSD fractions obtained from this synaptosomal fraction. Although the origin of the additional raft-associated receptors is not clear, our findings suggest that NMDARs move laterally from post-synaptic density regions not associated with lipid rafts to lipid rafts microdomains. We used the method described by Besshoh with some modifications to isolate synaptosomal fractions, synaptic lipid rafts and post-synaptic densities. As Besshoh *et al.* (2005) reported, the lipid raft fraction prepared from synaptosomes is heterogeneous, potentially containing rafts derived from the synaptic region itself, as well as rafts from perisynaptic and extrasynaptic membranes and from the pre-synaptic nerve terminal.

We show that the localization of NMDAR and PSD-95 in low density fraction is abolished by methyl- β -cyclodextrin (MBC) treatment. However, Besshoh found a high proportion of PSD-95 and NMDAR ($\approx 60\%$) associated with the rafts, while we detect a smaller proportion of PSD-95 in lipid raft fractions. Previous studies have reported the presence of as little as $\approx 10\%$ of PSD-95 in lipid rafts (Suzuki *et al.* 2001; Hering *et al.* 2003; Ma *et al.* 2003; Besshoh *et al.* 2005). The reasons for this variation are not known but may in part be related to different conditions of detergent extraction, it has been reported that protein to detergent ratio is important for the extraction of the lipid raft proteins, large solubilization may disrupt weak interactions of proteins with raft domains (Lingwood and Simons 2007). Besshoh and coworkers used a protein to detergent ratio of 1 : 1. Since the protein amount is less than 1 mg from the tissue obtained of each IC, the ratio that we used was ≈ 0.06 : 1. Therefore, extraction conditions that we used for the preparation of synaptic lipid rafts were more stringent, and NMDAR and

PSD-95 proteins that we obtained in lipid rafts fraction must have had a strong interaction with lipid rafts membrane.

NMDA receptor is not acylated, and therefore, a different mechanism must exist to bring them into these membrane subdomains. As it happens with the NMDAR, we found that water maze training increases the association of PSD-95 with lipid rafts, whereas it decreases in post-synaptic densities, without any change in synaptosomal fraction. PSD-95 is an adaptor protein that plays important roles in NMDAR synaptic targeting and signaling. This protein contains two palmitoylated cysteines within the N-terminal region, that allows its association with lipid rafts (Melkonian *et al.* 1999; Zacharias *et al.* 2002). Our results suggest that the translocation of PSD-95 to lipid rafts during spatial training brings NMDAR into these membrane subdomains. A study reported that mutant PSD-95 protein impaired water maze learning in mice (Migaud *et al.* 1998). Moreover, several studies have shown that the C-terminal T/SXV motifs of NR2A and NR2B can directly interact with the PSD-95/Dlg/ZO-1 (PDZ) domains of PSD-95. NMDAR-PSD-95 interaction induces the post-synaptic clustering of NMDARs. (Kornau *et al.* 1995; Kim *et al.* 1996; Chung *et al.* 2004), and palmitoylation of PSD-95 is essential and specific to this clustering (Melkonian *et al.* 1999; Zacharias *et al.* 2002). The palmitoylation of PSD-95 cannot be replaced by alternative membrane association motifs, suggesting that its interactions with lipid rafts are involved in NMDAR-PSD-95 clustering. The participation of lipid rafts in acetylcholine receptors clustering has been reported (Campagna and Fallon 2006; Stetzkowski-Marden *et al.* 2006). Clustering of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) requires association with rapsyn, a myristoylated membrane protein at the motor endplate (Gautam *et al.* 1995; Marchand *et al.* 2000). Disruption of lipid rafts inhibits nAChR clustering. Rapsyn, is located constitutively in lipid rafts and recruits the nAChR to lipid rafts in response to agrin (Zhu *et al.* 2006).

In the brain, mechanisms involved in receptor clustering and translocation into lipid rafts are less certain. However, in glutamatergic synapses the post-synaptic density protein PSD-95 could exert an equivalent function to the one displayed by rapsyn at the neuromuscular junction. PSD-95 could recruit NMDAR and other proteins to lipid rafts. This adaptor protein induces clustering and recruitment into lipid rafts of other proteins that are not acylated. Co-expression of PSD-95 increased the amount of Kv1.4 (voltage-gated potassium channels) and ErbB4 (Neuregulin receptor). Furthermore, deletion of the PSD-95 binding motif of Kv1.4 eliminated this recruitment, as did substituting a palmitoylation-deficient PSD-95 mutant (Ma *et al.* 2003). We do not know whether other proteins associate or not associated to PSD-95 are recruited to lipid rafts during training. However, in this paper we demonstrate that another protein present in lipid rafts (flotillin-1) did not change. Additional experiments in our laboratory show no change in

the amount of protein kinase C associated to lipid rafts in insular cortex after identical training protocol (unpublished observation). We also showed that NR2B subunits were recruited to lipid rafts in insular cortex but were not recruited in hippocampus. Taken together these data show the specificity of the proteins recruitment to lipid rafts during the training in different structures. Additionally, we showed that in parietal cortex, the spatial training did not induce changes in any subunit of the NMDAR.

Furthermore, we found that spatial training induced tyrosine 1472 NR2B subunit phosphorylation. NR2B tyrosine phosphorylation is at least partially mediated by a signaling cascade involving the sequential activation of protein kinase C, proline-rich tyrosine kinase 2 and Src family kinases (Chung *et al.* 2004). Nakazawa and collaborators identified Tyr-1472 of the NR2B subunit as the main phosphorylation site *in vitro* and have shown that this tyrosine is phosphorylated by fyn, a member of the Src family kinases. The level of Tyr-1472 phosphorylation is increased following the induction of LTP in the hippocampus, suggesting that fyn-mediated phosphorylation of Tyr-1472 is involved in synaptic plasticity (Nakazawa *et al.* 2002). However, Tyr-1472 phosphorylation may not regulate NMDAR channel properties but rather regulate NMDAR localization or downstream signaling pathways (Kohr and Seeburg 1996). Recently, Nakazawa showed that Y1472F mutant of the NR2B subunit shows improper localization at synapses in the amygdala (Nakazawa *et al.* 2006). Besshoh and collaborators reported that following ischemia the phosphorylation of NR2B (pY1472) was increased in both synaptic lipid rafts and PSDs. The increase was greater in synaptic lipid rafts than in PSDs. The NR2B Y1472 phosphorylation could be the trigger for NMDAR subunits translocation to the lipid rafts or it could be a consequence of the receptor undergoing a higher interaction with the kinases that phosphorylate it inside of the lipid rafts.

We also studied whether the translocation of NMDAR to lipid rafts occurs in the hippocampus because water maze learning has been extensively studied in this structure. We showed that NR2A and NR1 increased in the lipid rafts fraction; however, we did not find any increase of NR2B in the lipid rafts fraction. This result suggests that in the hippocampus, spatial training induces translocation only for the NR2A/NR1. Specifically, a differential participation of NR2A and NR2B subunits among different brain regions during synaptic plasticity induction has been reported. Liu and collaborators showed that selectively blocking NR2B in hippocampus abolishes the induction of long-term depression (LTD) but not LTP, whereas inhibition of NR2A prevents the induction of LTP without affecting LTD induction (Liu *et al.* 2004). However, another study reported that antisense oligonucleotides treatment to knock down NR2B subunit expression in the hippocampus of rats, abolished NMDA-dependent LTP, and impaired spatial learning (Clayton *et al.* 2002). Additionally it

was reported that the participation of both NR2A and NR2B subunits is essential for the induction of LTP in two-week old rat hippocampus (Bartlett *et al.* 2007) and in P28 mice hippocampus (Berberich *et al.* 2005). Similar to our results, it has been demonstrated that prefrontal cortex activation of both NR2B and NR2A was critical for the induction of LTP and contextual Fear Memory (Zhao *et al.* 2005). This variety of results suggests that the participation of NR2B subunit during synaptic plasticity varies with the model and stimulation protocol. With the training protocol used in this work (only 10 training trials in one day), only the recruitment of NR1/NR2A receptors to lipid rafts occurs in the hippocampus, whereas in the insular cortex recruitment of both NR2A and NR2B occurs during spatial training. These changes could be due to that NR2B activation allows a greater intracellular increase of calcium, since NR2A subunit has faster kinetics and smaller conductance than NR2B (Monyer *et al.*, 1994; Sheng *et al.*, 1994; Ritter *et al.*, 2002; Cull-Candy *et al.* 2001). NR2B receptor phosphorylation has been reported in the hippocampus after 4 days of water maze training (four trials per day) (Mizuno *et al.* 2003). After one day of training, we did not detect any change in NR2B phosphorylation in the hippocampus. Taken together these results suggest differential temporal regulation of NR2A and NR2B subunits in different structures.

The control group used for this study consisted of animals that swam for the same period of time as the trained animals, but in the absence of a platform as previously reported (Ramirez-Amaya *et al.* 1999, 2001; Aguilar-Valles *et al.* 2005, 2007). A strong stress response occurred at first day of training but this response is similar in both groups, trained and swimming control rats (Aguilar-Valles *et al.* 2005). Therefore stress, physical exercise, water odor or taste did not cause the redistribution of NMDAR and PSD-95.

In summary, our results suggest that spatial training results in an increase of NMDAR in lipid rafts and in the subunit NR2B Y1472 phosphorylation in the insular cortex. This translocation occurs in synaptic regions and these receptors probably move from the post-synaptic densities not associated with lipid rafts, since this movement correlates with a decrease in this fraction. In the hippocampus spatial training induces translocation only of NR2A and NR1 subunits while translocation of NR2B was not observed. The translocation of NMDAR subunits to lipid rafts could be a mechanism of synaptic plasticity; however, additional experimentation is required to elucidate the relationship between this mobility and the plasticity processes induced by spatial training.

Acknowledgements

We thank for helpful comments on the manuscript to Dr. Ana María López-Colomé and Jan Pascal Morin. We also thank Oreste Carbajal for technical assistance. This study was supported by CONACYT-México 060478 and DGAPA-UNAM IN-220706-3.

References

- Abulrob A., Tauskela J. S., Mealing G., Brunette E., Faid K. and Stanimirovic D. (2005) Protection by cholesterol-extracting cyclodextrins: a role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution. *J. Neurochem.* **92**, 1477–1486.
- Agular-Valles A., Sanchez E., de Gortari P., Balderas I., Ramirez-Amaya V., Bermudez-Rattoni F. and Joseph-Bravo P. (2005) Analysis of the stress response in rats trained in the water-maze: differential expression of corticotropin-releasing hormone, CRH-R1, glucocorticoid receptors and brain-derived neurotrophic factor in limbic regions. *Neuroendocrinology* **82**, 306–319.
- Agular-Valles A., Sanchez E., de Gortari P., Garcia-Vazquez A. I., Ramirez-Amaya V., Bermudez-Rattoni F. and Joseph-Bravo P. (2007) The expression of TRH, its receptors and degrading enzyme is differentially modulated in the rat limbic system during training in the Morris water maze. *Neurochem. Int.* **50**, 404–417.
- Bartlett T. E., Bannister N. J., Collett V. J., Dargan S. L., Massey P. V., Bortolotto Z. A., Fitzjohn S. M., Bashir Z. I., Collingridge G. L. and Lodge D. (2007) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus. *Neuropharmacology LTP: Forty Unforgettable Years. A Festschrift in Honour of Professor Tim Bliss FRS* **52**, 60–70.
- Becher A., White J. H. and Mellhinney R. A. (2001) The gamma-aminobutyric acid receptor B, but not the metabotropic glutamate receptor type-1, associates with lipid rafts in the rat cerebellum. *J. Neurochem.* **79**, 787–795.
- Berberich S., Punzakkal P., Jensen V., Pawlak V., Seeburg P. H., Hvalby O. and Kohr G. (2005) Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* **25**, 6907–6910.
- Besshoh S., Bawa D., Teves L., Wallace M. C. and Gurd J. W. (2005) Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. *J. Neurochem.* **93**, 186–194.
- Bobbot V. D., Iaria G. and Petrides M. (2004) Hippocampal function and spatial memory: evidence from functional neuroimaging in healthy participants and performance of patients with medial temporal lobe resections. *Neuropsychology* **18**, 418–425.
- Brown D. A. (2006) Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)* **21**, 430–439.
- Campagna J. A. and Fallon J. (2006) Lipid rafts are involved in C95 (4,8) agrin fragment-induced acetylcholine receptor clustering. *Neuroscience* **138**, 123–132.
- Chung H. J., Huang Y. H., Lau L. F. and Haganir R. L. (2004) Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J. Neurosci.* **24**, 10248–10259.
- Clayton D. A., Mesches M. H., Alvarez E., Bickford P. C. and Browning M. D. (2002) A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *J. Neurosci.* **22**, 3628–3637.
- Cull-Candy S., Brickley S. and Farrant M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 327–335.
- Davis S., Butcher S. and Morris R. (1992) The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J. Neurosci.* **12**, 21–34.
- Eichenbaum H., Stewart C. and Morris R. (1990) Hippocampal representation in place learning. *J. Neurosci.* **10**, 3531–3542.
- Fong D. K., Rao A., Crump F. T. and Craig A. M. (2002) Rapid synaptic remodeling by protein kinase C: reciprocal translocation of NMDA receptors and calcium/calmodulin-dependent kinase II. *J. Neurosci.* **22**, 2153–2164.
- Gautam M., Noakes P. G., Mudd J., Nichol M., Chu G. C., Sanes J. R. and Merlie J. P. (1995) Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* **377**, 232–236.
- Groc L., Heine M., Cognet L., Brickley K., Stephenson F. A., Lounis B. and Choquet D. (2004) Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat. Neurosci.* **7**, 695–696.
- Grosslans D. R. and Browning M. D. (2001) Protein kinase C activation induces tyrosine phosphorylation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor. *J. Neurochem.* **76**, 737–744.
- Guirland C., Suzuki S., Kojima M., Lu B. and Zheng J. Q. (2004) Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron* **42**, 51–62.
- Gutierrez H., Hernandez-Echeagaray E., Ramirez-Amaya V. and Bermudez-Rattoni F. (1999) Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience* **89**, 751–758.
- Harris E. W., Ganong A. H. and Cotman C. W. (1984) Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res.* **323**, 132–137.
- Hering H., Lin C. C. and Sheng M. (2003) Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J. Neurosci.* **23**, 3262–3271.
- Heynen A. J., Quinlan E. M., Bae D. C. and Bear M. F. (2000) Bidirectional, activity-dependent regulation of glutamate receptors in the adult hippocampus in vivo. *Neuron* **28**, 527–536.
- Kim E., Cho K. O., Rothschild A. and Sheng M. (1996) Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron* **17**, 103–113.
- King J. A., Burgess N., Hartley T., Vargha-Khadem F. and O'Keefe J. (2002) Human hippocampus and viewpoint dependence in spatial memory. *Hippocampus* **12**, 811–820.
- Kohr G. and Seeburg P. H. (1996) Subtype-specific regulation of recombinant NMDA receptor-channels by protein tyrosine kinases of the src family. *J. Physiol.* **492**, 445–452.
- Kornau H. C., Schenker L. T., Kennedy M. B. and Seeburg P. H. (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* **269**, 1737–1740.
- Lingwood D. and Simons K. (2007) Detergent resistance as a tool in membrane research. *Nat. Protoc.* **2**, 2159–2165.
- Liu L., Wong T. P., Pozza M. F., Lingenhoehl K., Wang Y., Sheng M., Auberson Y. P. and Wang Y. T. (2004) Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* **304**, 1021–1024.
- Ma L., Huang Y. Z., Pitcher G. M. et al. (2003) Ligand-dependent recruitment of the ErbB4 signaling complex into neuronal lipid rafts. *J. Neurosci.* **23**, 3164–3175.
- Malinow R. and Malenka R. C. (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* **25**, 103–126.
- Marchand S., Bignami F., Stetzkowski-Marden F. and Cartaud J. (2000) The myristoylated protein rapsyn is cotargeted with the nicotinic acetylcholine receptor to the postsynaptic membrane via the exocytic pathway. *J. Neurosci.* **20**, 521–528.
- Marta C. B., Taylor C. M., Coetzee T., Kim T., Winkler S., Bansal R. and Pfeiffer S. E. (2003) Antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein leads to its rapid repartitioning into detergent-insoluble fractions, and altered protein phosphorylation and cell morphology. *J. Neurosci.* **23**, 5461–5471.
- Melkonian K. A., Ostermeyer A. G., Chen J. Z., Roth M. G. and Brown D. A. (1999) Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins

- are acylated, while few are prenylated. *J. Biol. Chem.* **274**, 3910–3917.
- Migaud M., Charlesworth P., Dempster M. et al. (1998) Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* **396**, 433–439.
- Mizuno M., Yamada K., He J., Nakajima A. and Nabeshima T. (2003) Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation. *Learn. Mem.* **10**, 108–115.
- Monyer H., Burnashev N., Laurie D. J., Sakmann B. and Seeburg P. H. (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **12**, 529–540.
- Morris R. (1989) Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J. Neurosci.* **9**, 3040–3057.
- Morris R. G. M., Anderson E., Lynch G. S. and Baudry M. (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* **319**, 774–776.
- Mukherjee A., Arnaud L. and Cooper J. A. (2003) Lipid-dependent recruitment of neuronal Src to lipid rafts in the brain. *J. Biol. Chem.* **278**, 40806–40814.
- Nakazawa K., Quirk M. C., Chitwood R. A. et al. (2002) Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* **297**, 211–218.
- Nakazawa T., Komai S., Watabe A. M. et al. (2006) NR2B tyrosine phosphorylation modulates fear learning as well as amygdala synaptic plasticity. *EMBO J.* **25**, 2867–2877.
- Philpot B. D., Cho K. K. A. and Bear M. F. (2007) Obligatory role of NR2A for metaplasticity in visual cortex. *Neuron* **53**, 495–502.
- Quinlan E. M., Philpot B. D., Huganir R. L. and Bear M. F. (1999) Rapid, experience-dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex in vivo. *Nat. Neurosci.* **2**, 352–357.
- Radeva G. and Sharom F. J. (2004) Isolation and characterization of lipid rafts with different properties from RBL-2H3 (rat basophilic leukaemia) cells. *Biochem. J.* **380**, 219–230.
- Ramirez-Amaya V., Escobar M. L., Chao V. and Bermudez-Rattoni F. (1999) Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus* **9**, 631–636.
- Ramirez-Amaya V., Balderas I., Sandoval J., Escobar M. L. and Bermudez-Rattoni F. (2001) Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J. Neurosci.* **21**, 7340–7348.
- Ritter L. M., Vazquez D. M. and Mcador-Woodruff J. II (2002) Ontogeny of ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **139**, 227–236.
- Shallice T., Fletcher P., Frith C. D., Grasby P., Frackowiak R. S. J. and Dolan R. J. (1994) Brain regions associated with acquisition and retrieval of verbal episodic memory. *Nature* **368**, 633–635.
- Sheng M., Cummings J., Roldan L. A., Jan Y. N. and Jan L. Y. (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* **368**, 144–147.
- Simons M., Keller P., De Strooper B., Beyreuther K., Dotti C. G. and Simons K. (1998) Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons 10.1073/pnas.95.11.6460. *PNAS* **95**, 6460–6464.
- Stetzkowski-Marden F., Recouvreur M., Camus G., Cartaud A., Marchand S. and Cartaud J. (2006) Rafts are required for acetylcholine receptor clustering. *J. Mol. Neurosci.* **30**, 37–38.
- Suzuki T., Ito J., Takagi H., Saitoh F., Nawa H. and Shimizu H. (2001) Biochemical evidence for localization of AMPA-type glutamate receptor subunits in the dendritic raft. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **89**, 20–28.
- Tovar K. R. and Westbrook G. L. (2002) Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* **34**, 255–264.
- Townsend M., Yoshii A., Mishina M. and Constantine-Paton M. (2003) Developmental loss of miniature N-methyl-D-aspartate receptor currents in NR2A knockout mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 1340–1345.
- Zacharias D. A., Violin J. D., Newton A. C. and Tsien R. Y. (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**, 913–916.
- Zhao M.-G., Toyoda H., Lee Y.-S. et al. (2005) Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron* **47**, 859–872.
- Zhu D., Xiong W. C. and Mei L. (2006) Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J. Neurosci.* **26**, 4841–4851.

Resumen

Los receptores NMDA son uno de los elementos fundamentales durante la plasticidad sináptica. Pueden ser regulados por varios mecanismos, entre ellos la fosforilación, composición de subunidades y localización en la neurona. Recientemente se ha descrito que su localización en microdominios lipídicos de membrana conocidos como "rafts" puede regular la función del receptor. Existe evidencia de que dentro de los microdominios está más fosforilado que fuera de ellos y que la integridad de los microdominios es indispensable para la inducción de muerte excitotóxica inducida por NMDA. Estos datos sugieren que la localización en los microdominios cambia la funcionalidad del receptor. Por lo cual, el reclutamiento de receptores en los microdominios podría participar en la inducción de plasticidad sináptica. Para estudiar si esta translocación ocurre durante la formación de la memoria, se analizó la concentración de las subunidades del receptor NMDA en los microdominios lipídicos aislados de la corteza insular y el hipocampo de ratas entrenadas en el laberinto acuático de Morris.

Los resultados muestran que el entrenamiento no originó cambios en la síntesis de las subunidades del receptor ni la inserción de receptores en la sinapsis. Sin embargo, en la corteza insular, el entrenamiento aumentó la concentración de subunidades NR1, NR2A y NR2B en los microdominios y la disminuyó en la densidad postsináptica. En el hipocampo también se detectó un incremento de la concentración de los receptores NMDA pero solo de subunidades NR2A y NR1, la subunidad NR2B permaneció constante. La translocación de la subunidad NR2B correlaciona con un incremento en la fosforilación de su tirosina 1472 exclusivamente en corteza insular.

PSD-95, una proteína de la familia MAGUK (PSD-95, PSD-93, PSD97, y SAP102) también fue reclutada a los microdominios durante el entrenamiento en el laberinto acuático. Las proteínas de la familia MAGUK se unen al receptor NMDA a través de una secuencia (ESDV) en el dominio carboxilo terminal de las subunidades NR2. Esta interacción es importante para muchas de las funciones de los receptores NMDA, incluyendo la formación de agregados. PSD-95 y PSD-93 tienen dos palmitoilaciones en la región carboxilo terminal lo cual les permite localizarse en los microdominios lipídicos al mismo tiempo que acarrear a otras proteínas. Esta evidencia nos permitió especular que el receptor NMDA pueda ser reclutado a los microdominios mediante su interacción con PSD-95. Por lo cual, se estudiaron ratones que carecen de la última valina en la secuencia ESDV de NR2B. Esta mutación disminuyó aproximadamente 40% la concentración de receptores en los microdominios. Lo cual indica que la interacción con las proteínas de la familia MAGUK participa en la asociación del receptor con microdominios. Sin embargo, el análisis de los microdominios en ratones que carecen de la expresión de PSD-95 y PSD-93 mostró que la supresión de estas proteínas no afectó la concentración del receptor. La supresión completa del dominio carboxilo terminal de la subunidad NR1 disminuyó esta concentración aproximadamente 70%, lo cual indica que el carboxilo terminal es muy importante para la asociación del receptor a los microdominios. Sorprendentemente la mutación de la secuencia ESDV de la subunidad NR2B incrementó la concentración total de microdominios, por lo cual se propone que la actividad del receptor NMDA puede regular la síntesis de los microdominios lipídicos.

Abstract

NMDARs are the most important known trigger for synaptic plasticity. This receptor can be regulated by different process including phosphorylation, subunit composition, calpain cleavage and trafficking. Recent findings suggest that trafficking to lipid rafts regulate the NMDARs function. Rafts are regions of the membrane important in signal transduction, trafficking and sorting of membrane proteins. Recent evidence shows that the NMDARs are more phosphorylated inside lipid rafts than at the bulk of the membrane. Another study demonstrated that lipid rafts integrity is necessary to induce NMDA-dependant excitotoxicity. This information suggests that the localization of NMDAR inside lipid rafts could increases the efficiency of NMDAR. Therefore, activity-dependent NMDAR translocation to lipid rafts could be a mechanism of synaptic potentiation during plasticity process. In order to study the possible recruitment of NMDAR to lipid rafts during synaptic plasticity, we analyzed the amount of NMDAR subunits in lipid rafts from insular cortex and hippocampus of rats trained during one day in the Morris water maze.

Our results show that in insular cortex, spatial training induces translocation of NR1, NR2A and NR2B subunits to lipid rafts. This training does not change subunit expression, overall lipid raft recovery or insertion of NMDAR to synaptic membrane. Nevertheless, we observed increase of NMDARs in the lipid rafts and decrease in PSD fractions. Also in hippocampus, NR2A and NR1 are recruited to lipid rafts; however, the distribution of NR2B did not change. Furthermore, we found that spatial training induced phosphorylation of the tyrosine 1472 of NR2B subunits, only in cortex, because we did not detect this change in hippocampus. Taken together, these results suggest differential temporal regulation of NR2A and NR2B subunits in different structures.

Similar to NMDAR, PSD-95 was recruited to lipid raft during spatial memory formation, while decreased in post-synaptic densities. PSD-95 is an adapter protein member of MAGUK family (PSD-95, PSD-93, PSD97, and SAP102). Several studies have showed that the C-terminal ESDV motifs of NR2A and NR2B can directly interact with the PDZ domains of MAGUK family proteins. PSD-95 and PSD-93 have two palmitoylated cysteines in the N-terminal region, necessary for its association with lipid rafts. PSD-95 can induce recruitment to lipid rafts of other proteins, which are not acylated. We used mutant mice to study the role of PSD-95 and other MAGUK proteins in the association of NMDAR with lipid rafts. We analyzed the concentration of NMDAR in lipid raft from mutant mice without the last valine in the motif ESDV of the NR2B subunit. This deletion decreased approximately 40% the concentration of NMDAR in lipid rafts, which showed that MAGUK proteins are involved in the recruitment of NMDAR to rafts. However, using PSD-93 and PSD-95 KO mice, we showed that any of these proteins are not indispensable for the association of NMDAR with lipid rafts. We also showed that the intracellular c-terminal domain of NR2A is necessary for the association of 70% of the receptors with lipid rafts. During this research, surprisingly we discovered that the mutation of the ESDV motif of NR2B, which decreases 30% the NMDAR mediated EPSCs, increases the total amount of lipid rafts 30%. This suggests that NMDAR activity regulates lipid rafts synthesis.

Planteamiento del problema

Se sabe que el receptor NMDA es un elemento importante en la inducción de la plasticidad sináptica como es la formación de la memoria. La regulación del receptor NMDA puede darse mediante diversos mecanismos, tales como fosforilación, cambios en la proporción de las subunidades o en la cantidad y distribución de receptores en sinapsis. Sin embargo se desconoce cuáles son los mecanismos que intervienen en la formación de la memoria. El aprendizaje espacial ha sido extensamente estudiado en el hipocampo, no obstante, se ha demostrado recientemente que la CI también interviene en la formación de este tipo de memoria, sin embargo no existen estudios acerca de la regulación el receptor NMDA.

Recientemente se ha generado evidencia de que la asociación del receptor con microdominios lipídicos de la membrana es un mecanismo importante en la regulación del receptor NMDA. Esta evidencia sugiere que la asociación del receptor con los microdominios cambia la funcionalidad del receptor. Puesto que la plasticidad sináptica es el cambio en la eficiencia con la cual se comunican las neuronas, el reclutamiento de receptores en los microdominios lipídicos podría ser un mecanismo para ello. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado el papel de los microdominios lipídicos durante procesos de plasticidad, a pesar de que se ha demostrado su importancia en la traducción de señales en respuesta a estímulos como son los factores de crecimiento en el sistema nervioso. Por lo tanto, el estudio de la translocación del receptor NMDA durante el aprendizaje espacial sería la primera aproximación para conocer la contribución de los microdominios lipídicos en procesos de plasticidad sináptica.

Hipótesis

Durante la formación de la memoria espacial el receptor NMDA puede modularse por fosforilación, por cambios en la proporción de las subunidades, por inserción de receptores a la membrana sináptica, o por el reclutamiento de receptores NMDA hacia microdominios lipídicos, el cual podría ser un nuevo componente en la regulación funcional del receptor durante la plasticidad sináptica.

Objetivo General

Determinar en hipocampo y en CI si el aprendizaje de una tarea espacial induce cambios en la expresión de las subunidades, fosforilación, inserción de receptores a la sinapsis y/o el reclutamiento de receptores en microdominios lipídicos. Estudiar los mecanismos que le permite al receptor NMDA asociarse a los microdominios de membrana.

Objetivo específicos

- **Analizar la fosforilación de las subunidades NR2A Y NR2B inmediatamente después del aprendizaje de la tarea espacial del laberinto acuático de Morris.**
- **Estudiar si existe reclutamiento de receptores NMDA hacia los microdominios lipídicos durante el entrenamiento en el laberinto acuático de Morris en la CI y el hipocampo**
- **Determinar si durante el aprendizaje espacial existe un aumento en la concentración de receptores NMDA en sinaptosomas lo cual reflejaría un aumento en la inserción de receptores en la sinapsis.**

- **Determinar si el reclutamiento del receptor NMDA en regiones sinápticas se correlaciona con el decremento de la población de receptores que se asocia con la densidad postsináptica.**
- **Estudiar si las proteínas de la familia MAGUK están involucradas en la asociación del receptor con los microdominios lipídicos.**
- **Estudiar la contribución del dominio carboxilo terminal de las subunidades NR2 en su asociación con los microdominios lipídicos.**

Métodos

Entrenamiento

El entrenamiento se realizó en un laberinto acuático que consiste de un tanque circular de 1.5 m de diámetro y 1.0 m de alta, con fondo y paredes negras, con una plataforma transparente localizada en una posición fija y sumergido 1 cm. Este tanque está localizado en un cuarto iluminado con poca luz y rodeado por varias claves espaciales. El entrenamiento consiste de 10 ensayos. En cada ensayo el animal se introduce en el tanque en una de 10 posiciones preestablecidas azarosamente, se le permite nadar por un máximo de 60 s hasta que localice la plataforma, donde permanece por 30s. Si el animal no encuentra la plataforma en el límite de tiempo se le conduce hacia ella con la mano. Después de los 30 s en la plataforma, el animal descansa por 30s en una caja fuera del laberinto, antes del siguiente ensayo. Se mide en cada ensayo el tiempo en que la rata llega a la plataforma (latencia) mediante un sistema computarizado (Chromotrack 3, San Diego Instruments). Además de las ratas entrenadas se utiliza un grupo de ratas controles de nado, estas ratas fueron introducidas en 10 ocasiones al laberinto acuático sin la plataforma, en donde permanecieron en cada ensayo el mismo tiempo promedio que las ratas entrenadas. 24 horas después del entrenamiento se realizó la prueba, en la cual la rata nada durante 2 minutos en el laberinto acuático sin la plataforma. Se contaron las veces que la rata cruza por el sitio en donde se encontraba la plataforma el día del entrenamiento.

Aislamiento de los microdominios lipídicos

Se utilizó el método convencional basado en un gradiente de densidad ⁶³. Muestras de CI y de ratas sacrificadas inmediatamente después de la primera sesión de entrenamiento fueron homogenizadas en buffer de lisis para aislar microdominios (Tritón-X100 1%, NaCl 150mM, 25mM Tris-HCl pH 7.5, tableta de inhibidores de proteasas (Roche), 50mM NaF, 10mM NaP₂O₇, 1mM Ortovanadato de Na). 2 mg de proteínas de los homogenizados de corteza insular y 3.5 mg de homogenizado de hipocampo fueron centrifugados a 1500 x g por 10 min para retirar núcleos y restos celulares. En los experimentos con ratones se utilizó 3.5 mg de proteína de homogenizado de toda la corteza del ratón, pero se disminuyó a 0.5% la concentración de Tritón. El sobrenadante fue centrifugado a 15000 x g por 15 min para aislar complejos insolubles en Tritón. El precipitado (fracción insoluble) fue resuspendido en 0.5ml buffer del lisis para aislar microdominios y se mezcló con 1ml de sacarosa 2M, en buffer de gradientes (NaCl 150mM, 25mM Tris-HCl pH 7.5, tableta de inhibidores de proteasas). Esta mezcla fue colocada en el fondo de tubos (Ultra-Clear, Beckman) de 5ml y fue cubierta por 2ml de sacarosa 1M y 1.5M de sacarosa 0.2M. El gradiente fue centrifugado a 200000 x g por 18h en un rotor SW 65 TI. Todo el procedimiento se realizó a 4°C. Se colectaron 5 fracciones de 1 ml de la parte superior hasta el fondo del tubo. En los experimentos en los cuales se utilizaron ratones el precipitado fue resuspendido en buffer de gradientes sin sacarosa. 15 µl de cada fracción se corrieron en un gel de poliacrilamida de 7.5% y se realizaron los inmunoblots.

Aislamiento de sinaptosomas, microdominios sinápticos y densidad postsináptica.

El aislamiento de sinaptosomas, microdominios sinápticos y densidad postsináptica se realizó basándose en el protocolo descrito por Besshoh en 2005⁶⁷. Este protocolo se basa a su vez en las técnicas más utilizadas para aislar las densidades postsinápticas^{116, 117}. Se describe a continuación: muestras de CI de ratas sacrificadas inmediatamente después de la primera sesión de entrenamiento fueron lisadas con un homogenizador de teflón y vidrio, en 1 ml de buffer A (0.32 M sacarosa, 0.5 mM CaCl₂, 1 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, 1 mM NaF, 2 mM ortovanadato de sodio, 20 mM beta-glicerofosfato, tableta de inhibidores de proteasas de Roche). El homogenizado fue centrifugado a 1000 x g por 10 minutos, el precipitado fue resuspendido en 0.5 ml de solución A y centrifugado a 1000 x g por 10 minutos, los sobrenadantes de estas dos centrifugaciones se mezclaron y se centrifugaron a 15000 x g por 15 minutos, el precipitado fue resuspendido en 1 ml de solución B (los mismos componentes del buffer A pero sin CaCl₂ y sin MgCl₂). Este homogenizado se colocó sobre un gradiente de densidad de sacarosa compuesto por 1.3 ml de sacarosa 1.2M, 1M y 0.85M. El gradiente se centrifugó a 82500 x g por 2 horas. La banda que está en la interfase entre 1M y 2M de sacarosa corresponde a la fracción sinaptosomal, la cual fue recuperada y se diluyó en 1 volumen de solución B y 2 de solución C (los mismos componentes de la solución B pero sin sacarosa, y NaHCO₃). Se centrifugó la muestra a 100000x g por 1 hora para precipitar los sinaptosomas y se resuspendió en 1.5 ml de sacarosa 40% en solución B con Tritón 1%, después de una incubación de 30 minutos la muestra se colocó en la parte inferior de un gradiente con 2.5 ml de sacarosa 35% y 1 ml de sacarosa 6%. Se centrifugó durante 18 horas a 200000 x g. Todo el procedimiento se realizó a 4°C. Se colectaron 10 fracciones de 0.5 ml de la parte superior hasta el fondo del tubo. El precipitado, que corresponde a la densidad

postsináptica (PSD) que no contiene microdominios, fue resuspendido en buffer C. Volúmenes iguales de cada fracción se corrieron en un gel de poliacrilamida de 7.5% y se realizaron los Western blots.

Inmunoprecipitación

Las muestras fueron homogenizadas en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P40 1% o Tritón 1%, Ortovanadato de Sodio 10 mM, NaF 25 mM, inhibidores de proteasas Roche, pH 7.5). Todos los procedimientos se realizaron a 4°C. Se centrifugó a 1500 x g por 5 minutos para retirar núcleos y restos celulares grandes. Se estimó la concentración de proteínas mediante ensayo de Lowry. (Bio-Rad Dc Protein Assay). Las subunidades NR2A o NR2B se inmunoprecipitaron a partir de 2 a 3 mg de proteína con 12µl de anticuerpo monoclonal específico para NR2A o NR2B (1:500 Santa Cruz Biotechnology) en 0.5ml de buffer de lisis, se incubó toda la noche posteriormente se agregó 30µl de proteína G-agarosa (Roche), y se incubó a 4°C en agitación constante durante 2 horas, después se centrifugó por 2 minutos a 1500 x g. El precipitado se lavó 2 veces con 300 µl de buffer de lisis, 2 veces más con buffer de alta concentración de sales (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P40 0.1% o Tritón 0.1%, pH 7.5) y para retirar las sales se realizó un lavado con Tris-HCl 50 mM pH 7.5, Nonidet P40 0.1% o Tritón 0.1%. Las centrifugaciones entre cada lavado se realizaron a 1500 x g. Después de estos lavados se centrifugó a 5000 x g durante 3 minutos, se retiró el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 20 µl de buffer Laemmli con 10% de β-mercapto-etanol. Se hirvieron las muestras durante 5 minutos y se

centrifugó a temperatura ambiente a 2000 x g durante 3 min. Las muestras fueron probadas en un Western Blot.

Western Blot

20 µg de proteína de lisado de hipocampo al igual que las muestras de los gradientes y de la inmunoprecipitación fueron mezcladas con buffer Leammli 1:1 y hervidas durante 5 minutos. Posteriormente fueron cargadas en un gel 7.5% SDS-poliacrilamida. La electroforesis se llevó a cabo a 110V durante una hora y media. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (BioRad) a 25 V por 50 minutos. El buffer de transferencia estuvo compuesto de 25mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS y 20% (vol/vol) de metanol. La membrana resultante de la transferencia se incubó toda la noche en buffer TBS-T (Tris 10mM, NaCl 0.9%, Tween 20 0.1% pH 7.5) con 5% de BSA. Para detectar las subunidades del receptor NMDA, las membranas de PVDF fueron incubadas 24 horas a 4°C con: anticuerpo anti NR2A y anti NR2B policlonales hechos en cabra (1:500; Santa Cruz Biotech.); Anti NR2B fosfotirosina 1472 hecho en conejo (1:1000; Sigma); Anti fosfotirosinas monoclonal hecho en ratón (1:500; Sigma).

Las membranas se lavaron durante 5 minutos 4 veces en TBS-T, y se incubaron por una hora con anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano (Anti ratón hecho en cabra IgG Zimed; Anti cabra hecho en burro IgG Sigma; Anti conejo hecho en ratón IgG Sigma). Las membranas se lavaron 4 veces por 5 minutos con TBS-T y 2 veces con TBS. Después la membrana se incubó con sustrato quimioluminiscente HRP (ImmobilonTMWester, Millipore) y se expuso en placas radiográficas. La inmunoreactividad se cuantificó densitométricamente con el software ImageJ 1.31V, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA. Los controles negativos se hicieron sin agregar los anticuerpos primarios.

A las membranas que se les quitó el anticuerpo para posteriormente incubarla contra otro anticuerpo, se lavaron 2 veces durante 20 minutos a 37°C en buffer de elución Tris 62.5 mM, 2% SDS, β -mercaptoetanol 100 mM), se lavaron 5 veces con TBS-T, se bloquean con BSA 5% durante media hora y se incubó con el anticuerpo correspondiente.

Resultados

Curva de aprendizaje en el laberinto acuático de Morris.

Las ratas fueron entrenadas durante 10 ensayos en el laberinto acuático y se midió el tiempo que tardan en llegar a la plataforma de escape en cada ensayo (latencia). Las ratas control nadaron en el laberinto acuático sin la plataforma el mismo tiempo promedio que las entrenadas. Como se puede observar en la figura 3, la latencia disminuye en cada ensayo, lo cual refleja el aprendizaje de esta tarea. 24 horas después del entrenamiento se realizó la prueba de memoria, en la cual la rata nada durante 2 minutos en el laberinto acuático sin la plataforma. Se contaron las veces que la rata cruza por el sitio en donde se encontraba la plataforma el día del entrenamiento. Diez ensayos son suficientes para que esta memoria se consolide como una memoria de largo plazo medida 24 horas después del entrenamiento ya que las ratas entrenadas cruzaron mayor cantidad de veces que los controles de nado el sitio donde se encontraba la plataforma durante el entrenamiento (Figura 3).

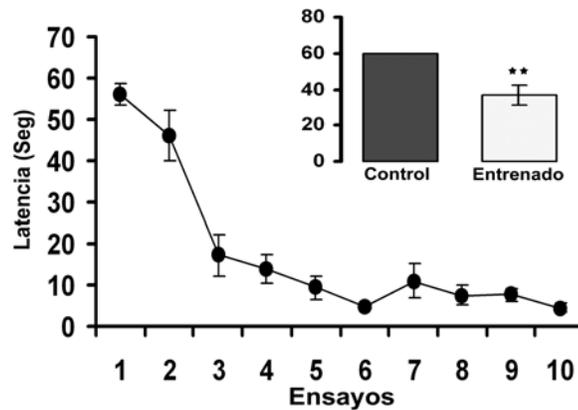


Figura 3. Curva de aprendizaje. La gráfica muestra la latencia promedio (\pm error estándar) para encontrar la plataforma durante el aprendizaje en el laberinto acuático de Morris ($n = 9$). El grupo control nadó el mismo tiempo promedio que las ratas entrenadas en cada ensayo. La gráfica interior muestra la latencia (\pm error estándar) de las ratas entrenadas y las controles ($n = 5$) durante una prueba 24 horas después del entrenamiento.

El entrenamiento espacial incrementó la fosforilación en tirosinas de la subunidad NR2B

Con el fin de determinar si la fosforilación de la subunidad NR2B del receptor NMDA cambia con el entrenamiento, se analizó la fosforilación total en tirosina de la subunidad NR2B mediante la inmunoprecipitación de la subunidad e inmunoblot contra proteínas fosforiladas en residuos de tirosina. Como se muestra en la figura 4, no se logró detectar cambios en la fosforilación de la subunidad NR2B entre las muestras de ratas entrenadas y controles de nado después de una sesión de 10 ensayos en el laberinto acuático.

En otra tarea espacial (laberinto radial) se ha reportado incremento en la fosforilación en tirosinas a partir de tejido del hipocampo obtenido después de un mayor número de sesiones de entrenamiento (4 a 8 sesiones), por lo que analizamos la fosforilación del receptor después de 5 sesiones de entrenamiento en

el laberinto acuático. El inmunoblot mostró que el entrenamiento durante 5 sesiones induce un aumento en la fosforilación en tirosinas en el inmunoprecipitado de la subunidad NR2B en el hipocampo y no en la CI, lo cual concuerda con lo reportado usando el laberinto radial ya que una sola sesión de entrenamiento en esta tarea tampoco incrementó de manera detectable la fosforilación mientras que 4 sesiones si la incrementaron ¹¹⁵.

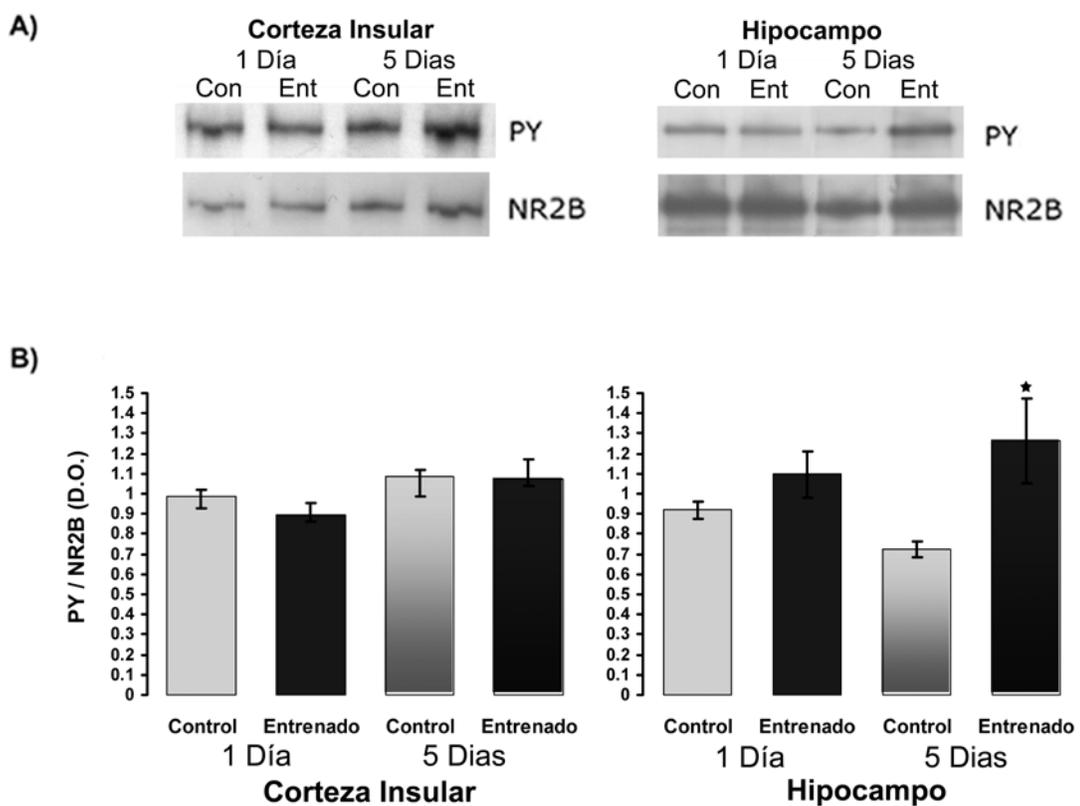


Figura 4. Fosforilación de las tirosina de la subunidad NR2B. A) La subunidad NR2B fue inmunoprecipitada a partir de lisado de CI o hipocampo de ratas entrenadas y controles de nado (1 animal por muestra), se realizó inmunoblot contra las tirosinas fosforiladas (PY) y contra la subunidad NR2B. B) La densidad óptica de las bandas fue cuantificada. Los resultados se muestran como la densidad óptica de la banda correspondiente a la fosforilación entre el total de la subunidad NR2B (promedio \pm error estándar), $n=8$, $*p < 0.05$.

Se realizaron varios controles de la especificidad de la detección de la fosforilación de la subunidad NR2B. La aplicación del procedimiento de inmunoprecipitación sin anticuerpo o la inmunoprecipitación un anticuerpo que reconoce una proteína diferente (GLUR1) a la subunidad NR2B no produce ninguna señal en el inmunoblot contra proteínas fosforiladas en tirosinas o contra las subunidades del receptor NMDA (Figura 5). El inmunoblot en ausencia de anticuerpo primario tampoco originó ninguna banda detectable. El análisis de la fosforilación total en tirosinas mediante inmunoprecipitación de la subunidad NR2B detecta la fosforilación total de todos los residuos forforilables de la subunidad NR2B. Sin embargo, el anticuerpo antifosfotirosinas también reconoce las tirosinas fosforiladas de las subunidades NR2A que co-precipitan con el NR2B, ya que el inmunoblot de la subunidad NR2B mostró que una cantidad apreciable de receptor NR2A co-precipita con el receptor NR2B (Figura 5).

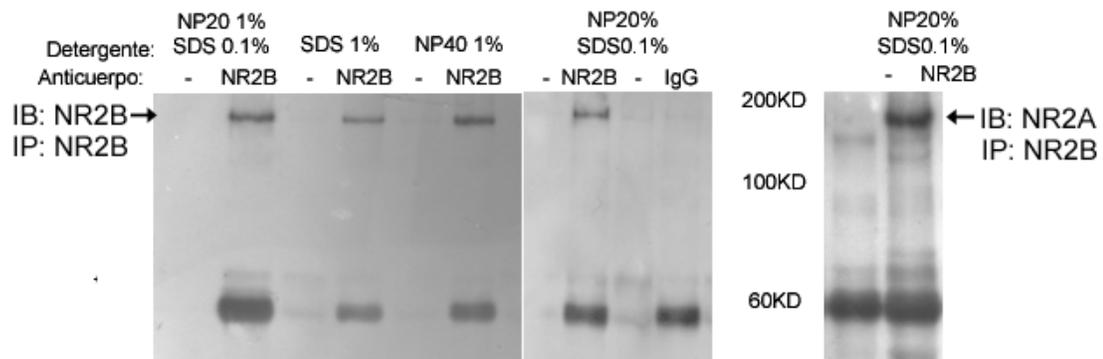


Figura 5. Controles de inmunoprecipitación. Se realizó la inmunoprecipitación (IP) contra la subunidad NR2B con diferentes detergentes, sin anticuerpo o con una inmunoglobulina que no reconoce NR2B. A partir del inmunoprecipitado, se realizó inmunoblot (IB) contra NR2B o NR2A como se indica.

Debido a que ambas subunidades NR2 tienen el mismo peso molecular no es posible diferenciar entre todos los residuos fosforilados de la subunidad NR2B y los de la subunidad NR2A, así que la figura 4 muestra la fosforilación total de las tirosinas de la subunidad NR2B sumada a la fosforilación en tirosinas de la subunidad NR2A que co-precipitó con NR2B. Los cambios moderados en uno de los residuos de cualquiera de las subunidades posiblemente no puedan ser detectados mediante esta técnica. Por esta razón se analizó la fosforilación específica del residuo 1472 de la subunidad NR2B el cual ha sido implicado en procesos de plasticidad sináptica. Para ello se realizó la inmunoprecipitación del receptor NR2B y se analizó por Western blot la fosforilación del residuo 1472 de la subunidad NR2B mediante el uso de un anticuerpo que reconoce específicamente a este residuo fosforilado. Como se puede ver en la figura 6, una sola sesión de entrenamiento induce un incremento de aproximadamente 30% en la fosforilación de la tirosina 1472 de la subunidad NR2B en la CI pero no en el hipocampo. Los controles realizados muestran que esta fosforilación es específica del receptor NR2B ya que la inmunoprecipitación sin anticuerpo o el inmunoblot sin anticuerpo primario no produjeron ninguna señal detectable (Figura 6C). No se realizaron más controles acerca de la especificidad del anticuerpo para reconocer el residuo 1472 fosforilado, sin embargo el uso de este anticuerpo con este propósito ha sido ampliamente reportado.

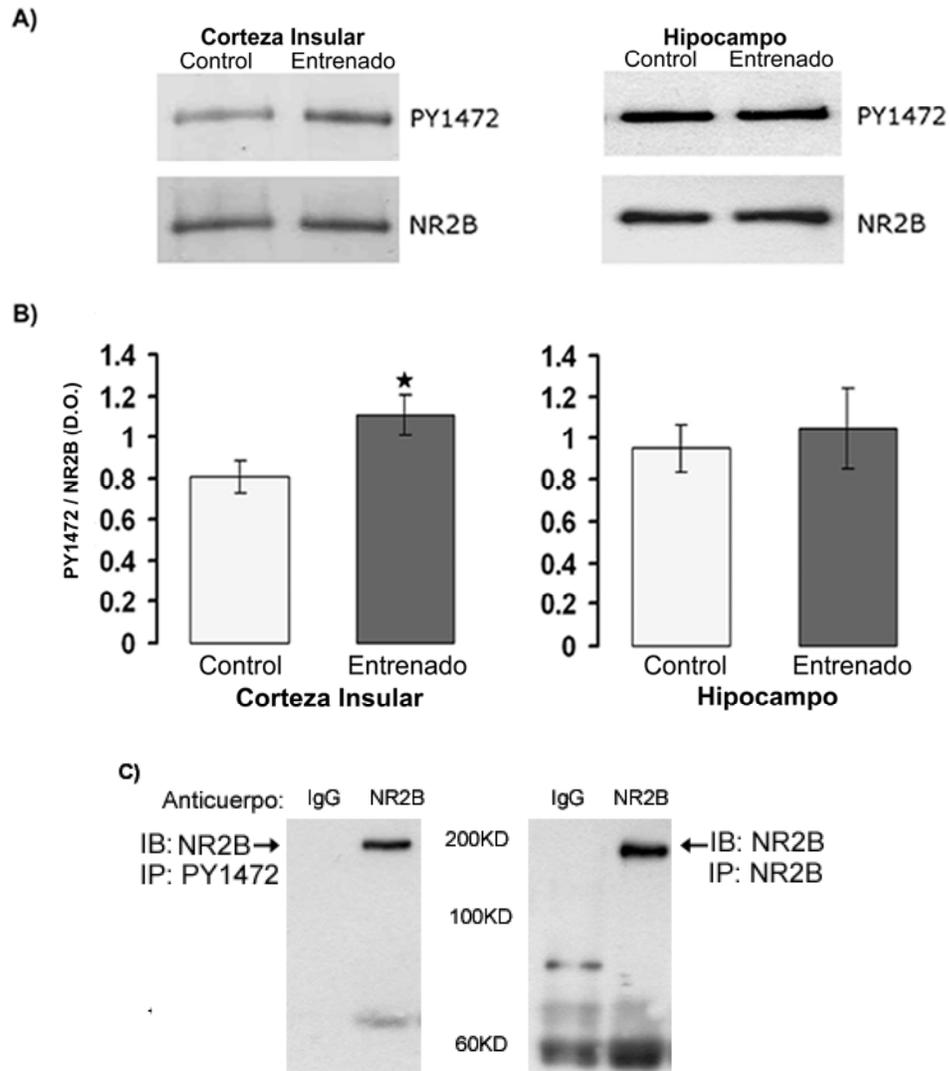


Figura 6. Efecto del entrenamiento sobre la fosforilación de la Y1472 de NR2B (PY1472).

A) La subunidad NR2B fue precipitada a partir de lisado de CI o hipocampo de ratas entrenadas y controles de nado (1 animal por muestra), se realizó inmunoblot contra la PY1472 y NR2B. B) Los resultados de la cuantificación de la densidad óptica de las bandas se muestran como fosforilación entre el total de la subunidad NR2B (promedio \pm error estándar). CI n=9, hipocampo n=12, *p < 0.05. C) Controles de inmunoprecipitación. Se realizó la inmunoprecipitación con la IgG que reconoce a la subunidad NR2B y con una IgG que no lo reconoce, se realizó inmunoblot contra PY1472 y contra NR2B.

En entrenamiento incrementó la concentración de los receptores NMDA en los microdominios lipídicos

Para determinar si el entrenamiento en el laberinto acuático induce el reclutamiento de receptores NMDA en microdominios lipídicos se estandarizó un método ya reportado para aislar microdominios lipídicos mediante un gradiente de sacarosa a partir de la fracción insoluble de tejido cerebral. Se colectaron 5 fracciones de 1ml de la parte superior a la parte inferior del gradiente. Como se muestra en la figura 7, en las fracciones ligeras del gradiente se puede detectar a las subunidad NR2B de los receptores NMDA en la fracción 2, mientras que en el resto de las fracciones solo se detecta en la 5. En la fracción 2 también se concentran marcadores de microdominios lipídicos como la flotillina-1, el gangliósido GM1 y el colesterol mientras que en las otras fracciones no existe una cantidad detectable de estas moléculas. También se observa que la distribución de proteínas en el gradiente, cuantificadas mediante el método de Bradford, concuerda con lo reportado ⁷¹ (Figura 7).

Una vez estandarizado el método, se aislaron microdominios lipídicos a partir de muestras de CI de ratas entrenadas por un día y controles de nado. Se analizó la concentración de las subunidades NR1, NR2A y NR2B en el mismo volumen de muestra mediante inmunoblot específico para cada proteína. Se analizó la fracción enriquecida en microdominios lipídicos (2) y la fracción 5, en donde se reporta se localiza citoesqueleto, densidad postsináptica y otros complejos insolubles con alta densidad ⁶³. Sin embargo la mayor parte de la densidad postsináptica permanece en el precipitado como se mostrará posteriormente. Las muestras de ratas entrenadas tuvieron un incremento de la concentración de NR2B y NR2A en la fracción ligera 2 comparadas con los controles de nado, mientras que no se detecta

un cambio en las fracciones densa. Por lo tanto esto sugirió que el entrenamiento indujo la translocación del receptor NMDA a microdominios lipídicos de membrana (Figura 8).

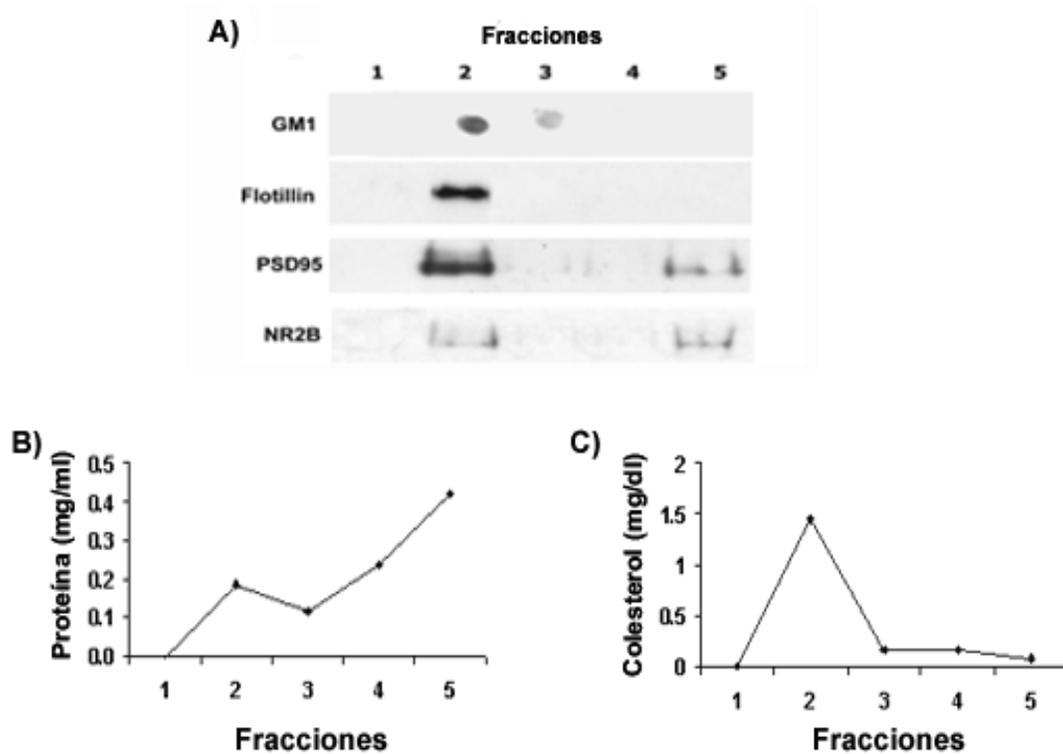


Figura 7. Aislamiento de los microdominios lipídicos a partir de extracto insoluble. Se aisló la fracción insoluble en Tritón x-100 y se separó en un gradiente de sacarosa. 5 fracciones fueron obtenidas e igual volumen de cada una fue analizado mediante Western blot para las proteínas indicadas y mediante dot blot con toxina de cólera la concentración de GM1(A). B) Mediante el método de Bradford se analizó la cantidad de proteínas en cada fracción. C) Se analizó la cantidad de colesterol mediante un ensayo colorimétrico basado en la oxidación del colesterol.

Debido a que las subunidades del receptor se detectaron únicamente en las fracciones 2 y 5 se realizó la cuantificación de la densidad óptica solo para estas

fracciones y se graficó la relación de la densidad óptica correspondiente a las ratas entrenadas entre la correspondiente a las ratas control (Figura 8).

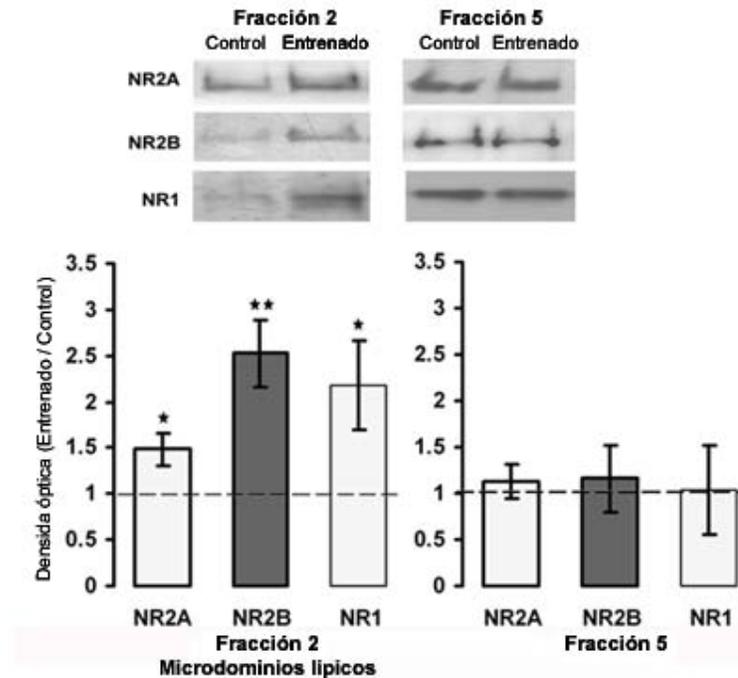


Figura 8. Efecto del entrenamiento en la concentración de receptor NMDA en microdominios de membrana. Se aislaron microdominios lipídicos a partir de las cortezas insulares (2 ratas por muestra) de ratas entrenadas y controles de nado. Volúmenes iguales de la fracción 1 y la fracción 5 fueron analizados mediante un inmunoblot contra las proteínas indicadas. Las gráficas muestran el análisis densitométrico de 5 experimentos independientes, los resultados se muestran como promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al control (densidad óptica del entrenado / control). ** $p < 0.01$, $p < 0.05$.

La concentración total los receptores NMDA en los sinaptosomas no cambió

Como se mencionó en la introducción, la inserción de receptores a la membrana sináptica provenientes de pozas intracelulares durante procesos de

plasticidad ya ha sido reportado con anterioridad. Así que el incremento en la concentración de receptores NMDA en los microdominios lipídicos podría deberse a un incremento en la inserción de receptores a la membrana sináptica y no a un desplazamiento lateral del receptor en la membrana hacia los microdominios lipídicos.

Para determinar si existe un incremento en la inserción de receptores a la membrana sináptica después de una sesión de entrenamiento en el laberinto acuático, se analizó la concentración de receptor NMDA y PSD-95 en sinaptosomas aislados a partir de muestras de CI. En la figura 9 se muestra alta concentración de subunidades NR2B en 10 fracciones del gradiente de sacarosa. Este método ha sido ampliamente reportado para aislar sinaptosomas, los cuales conservan la membrana postsináptica y la PSD ^{116, 117}. Las fracciones 6, 7 y 8 están enriquecidas en receptor NMDA lo cual concuerda con lo reportado ya que los sinaptosomas se localizan en la interfase entre 1 M y 0.2 M de sacarosa ¹¹⁶. También se puede observar que 3 μ g de la fracción sinaptosomal tiene una concentración de PSD-95 (considerado marcador de densidad postsináptica) un poco menor a 30 μ g de proteínas del lisado crudo, por lo cual se puede concluir que esta fracción efectivamente está enriquecida en membrana postsináptica y densidad postsináptica.

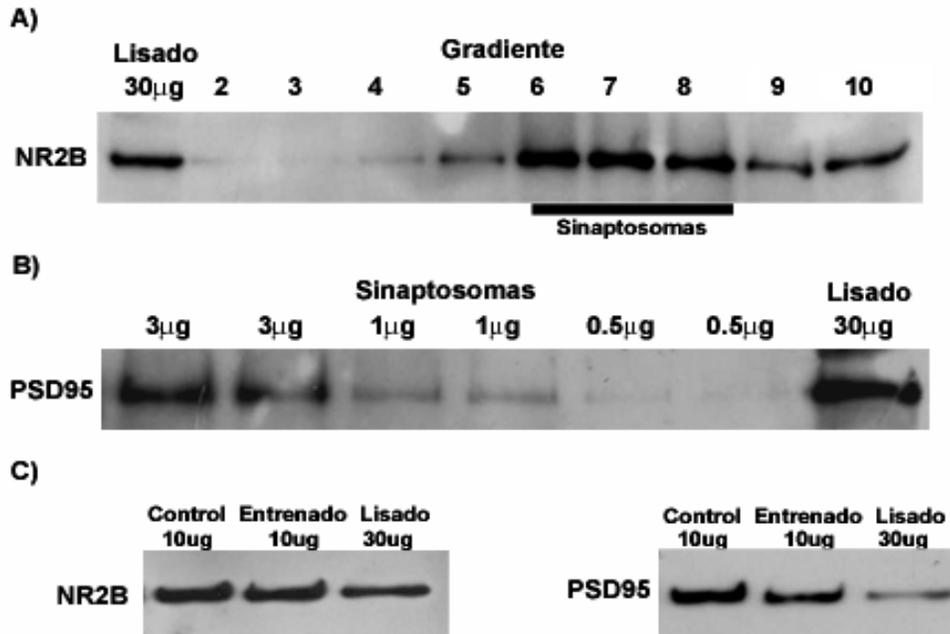


Figura 9. Aislamiento de sinaptosomas y PSD. Se realizó el gradiente de sacarosa para aislar sinaptosomas a partir de corteza. A) Se colectaron 10 fracciones del gradiente, el precipitado está incluido en la fracción 10. Se analizó mediante Western blot, la concentración de la subunidad NR2B en igual volumen de cada fracción (la fracción 1 no fue analizada) B) Se midió concentración de proteínas mediante el método do Lowry y se analizó mediante Western blot la concentración de PSD-95 en 0.5, 1, y 3 µg de proteína de fracción sinaptosomal y 30µg de lisado crudo. C) Se aisló la densidad postsináptica mediante el método descrito por Besshoh (2005) a partir de los sinaptosomas y se analizó 10µg de este extracto y 30µg de lisado crudo mediante Western blot para detectar NR2B y PSD-95.

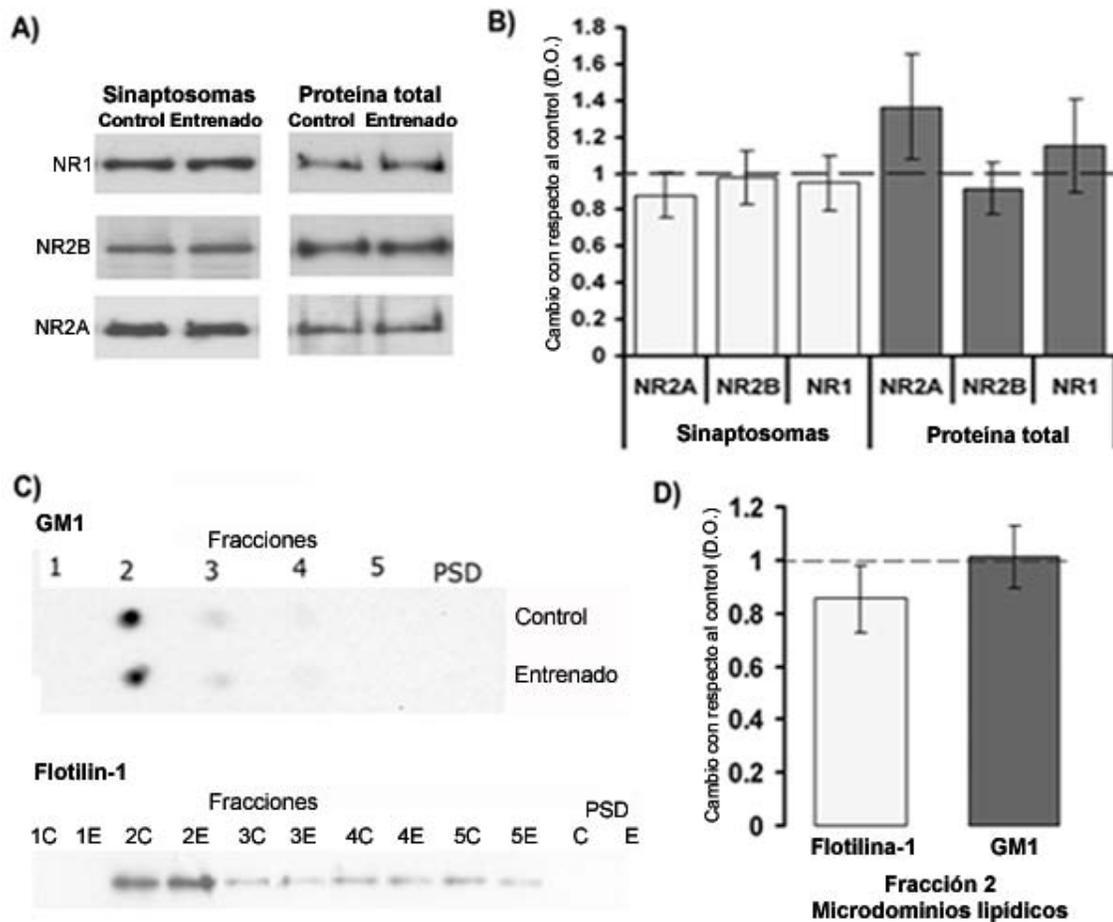


Figura 10. Efecto del entrenamiento en la concentración de receptor NMDA en los sinaptosomas y en la concentración de microdominios lipídicos. A) Análisis mediante Western blot de la concentración de receptor NMDA en 3 μ g de proteína de sinaptosomas (cortezas insulares de 3 ratas por muestra) y 10 μ g de lisado crudo (cortezas insulares de 1 rata por muestra) B) Análisis densitométrico de 4 experimentos independientes como el mostrado en A. C) Análisis de volúmenes iguales de las fracciones del gradiente de sacarosa para aislar los microdominios mediante Western blot para detectar flotilina-1 y dotblot para detectar GM1. D) Análisis densitométrico de 4 experimentos independientes como el mostrado en C. Los resultados se expresan como promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al control (densidad óptica del entrenado entre el control).

Posteriormente se analizó la concentración de receptor NMDA en los sinaptosomas de ratas sacrificadas inmediatamente después del entrenamiento en el laberinto acuático y controles de nado. Como se observa en la figura 10 no existen cambios significativos $p > 0.05$ en la concentración de receptor NMDA o PSD-95 en las fracciones sinaptosomales de ratas entrenadas comparadas con los controles de nado. También se analizó la concentración total de receptor NMDA en el homogenizado crudo de tejido de CI, el entrenamiento no induce un incremento en la síntesis de ninguna de las subunidades analizadas (Figura 10).

Estos resultados sugieren que el incremento en la concentración de receptor NMDA asociado a los microdominios no se debe al incremento en la síntesis de receptores o en la inserción de receptores en la membrana sináptica provenientes de pozas intracelulares.

Incremento de receptores NMDA y PSD-95 en los microdominios lipídicos y disminución en la PSD obtenida de sinaptosomas.

Los resultados anteriores mostraron que el entrenamiento no induce un incremento en la concentración de receptores NMDA en la fracción sinaptosomal, sin embargo se desconocía si el reclutamiento de receptores NMDA hacia los microdominios ocurre en membrana sináptica. Por lo cual se aislaron los microdominios a partir de fracciones sinaptosomales y se separó la densidad postsináptica que no está asociada a los microdominios mediante el mismo gradiente, utilizando un método ya reportado⁶⁷. Se extrajeron 10 ó 5 fracciones del gradiente de sacarosa, el precipitado fue resuspendido mediante sonicación en el mismo amortiguador del gradiente. Se analizó mediante Western blot un volumen

igual de cada fracción del gradiente de sacarosa y del precipitado. Como se muestra en la figura 11, cuando se extraen 10 fracciones, en las fracciones ligeras 3 y 4 se pueden detectar los marcadores de microdominios (Flotillita-1 y GM1), las subunidades del receptor NMDA y PSD-95. En la figura también se muestra que al incubar la fracción sinaptosomal 30 minutos con β -metil-ciclodextrina antes de la centrifugación las bandas correspondientes a PSD-95 y a las subunidades del receptor NMDA desaparecen. Esto es otra evidencia de que los receptores NMDA al igual que la PSD-95 de las fracciones ligeras se encontraban asociados a microdominios lipídicos.

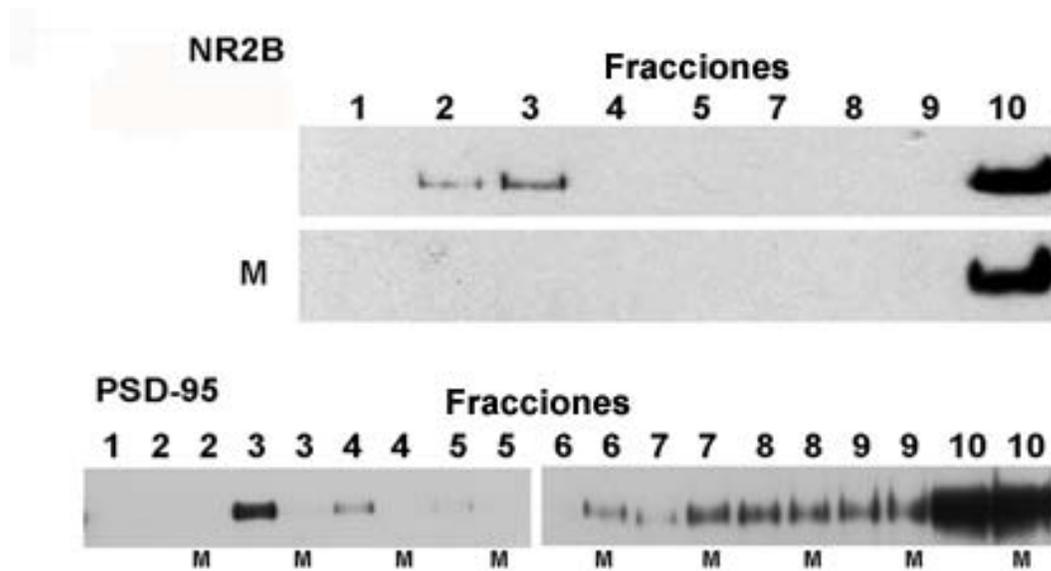


Figura 11. Distribución de la subunidad NR2B y de PSD-95 en el gradiente de sacarosa y efecto de la remoción de colesterol. Los sinaptosomas extraídos de la corteza fueron incubados con 50mM de metil- β -ciclodextrina (M) o sin el fármaco durante 30 minutos antes de la separación en el gradiente de sacarosa para aislar microdominios lipídicos. Se colectaron 10 fracciones del gradiente y el precipitado fue resuspendido en 1 ml del mismo amortiguador. Se analizó mediante Western blot volúmenes iguales de cada fracción.

Al aislar los microdominios y la densidad postsináptica a partir de la CI de ratas entrenadas y controles de nado se observa un aumento en la concentración de NR1, NR2A y NR2B en la fracción enriquecida en microdominios y una disminución en la densidad postsináptica (Figura 12). Lo cual sugiere que los receptores NMDA que se incorporan a los microdominios no provienen de pozas somáticas, sino que provienen de regiones membranales solubles.

Debido a que PSD-95 es una de las principales proteínas adaptadoras que se unen al receptor NMDA se analizó la concentración de PSD-95 en los sinaptosomas, en los microdominios lipídicos y en la densidad postsináptica (PSD). Como se puede ver en la figura 13, al igual que sucede con el receptor NMDA, PSD-95 se transloca a los microdominios lipídicos sinápticos y disminuye en la densidad postsináptica. No se observen cambios en el total de PSD-95 en los sinaptosomas. El aumento en la concentración de PSD-95 en los microdominios parece ser más grande que el aumento del receptor NMDA (Figura 13).

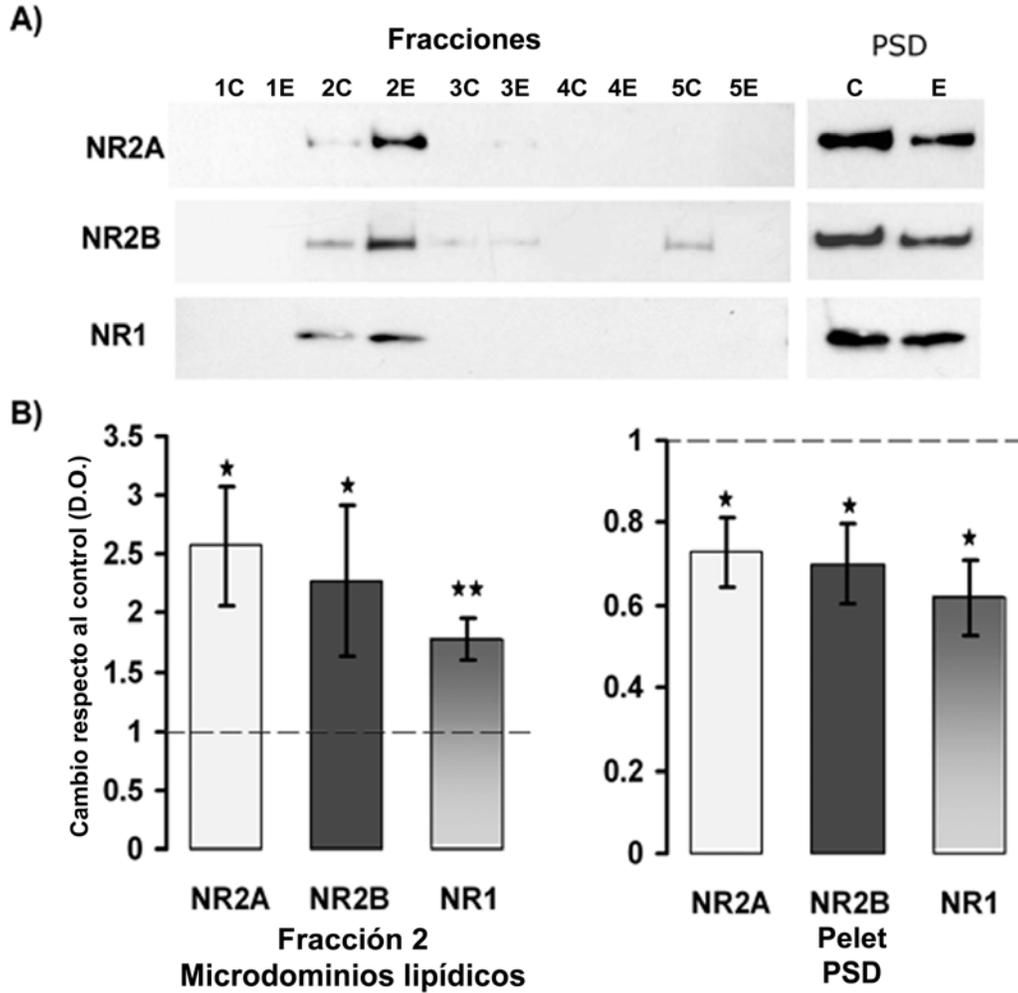


Figura 12. Efecto del entrenamiento en la concentración de receptor NMDA en los microdominios sinápticos. A) Análisis mediante Western blot del gradiente de sacarosa para aislar microdominios lipídicos y PSD a partir de sinaptosomas de ratas entrenadas y controles de nado (3 ratas por muestra), se analizaron volúmenes iguales de cada fracción. B) Análisis densitométrico de las fracciones 2 y 6 (6 experimentos independientes como el mostrado en A), los resultados se muestran como promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al control (densidad óptica del entrenado / control). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

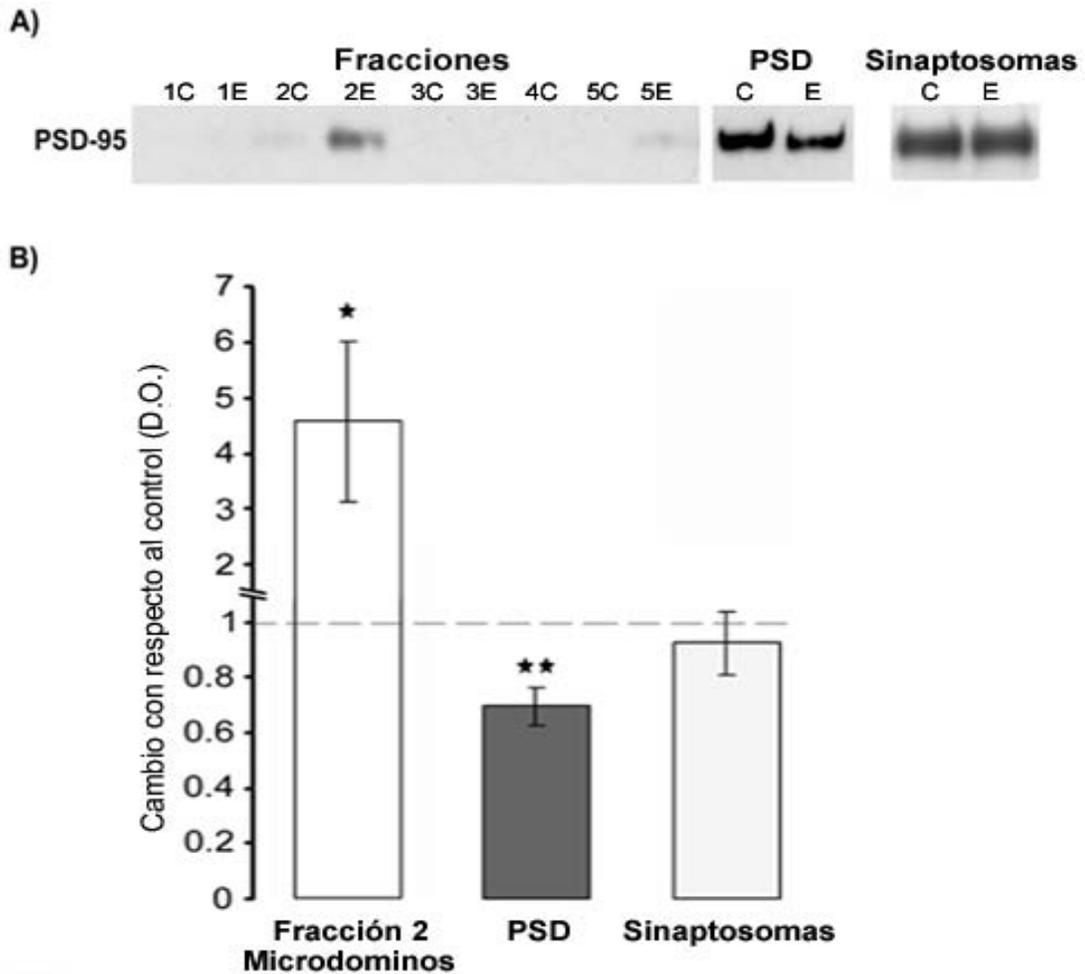


Figura 13. Efecto del entrenamiento en la concentración de PSD-95 en los microdominios sinápticos, PSD y sinaptosomas. A) Análisis mediante Western blot de la fracción sinaptosomal (3µg de proteína) y del gradiente de sacarosa par aislar microdominios lipídicos y PSD de ratas entrenadas y controles de nado (3 ratas por muestra), se analizaron volúmenes iguales de cada fracción. B) Análisis densitométrico de las fracciones 2, 6 y sinaptosomal (6 experimentos independientes como el mostrado en A), los resultados se muestran como promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al control (densidad óptica del entrenado / control). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

El entrenamiento espacial también indujo reclutamiento de receptores NMDA en el hipocampo.

Como ya se mencionó anteriormente, el aprendizaje espacial y principalmente la intervención del receptor NMDA ha sido ampliamente estudiada en el hipocampo, razón por la cual decidimos investigar si el reclutamiento de receptores NMDA a microdominios de membrana ocurre de la misma manera en esta estructura.

Se aislaron microdominios de membrana a partir de la fracción insoluble de homogenizado de la región dorsal del hipocampo. Se analizó un volumen igual de las fracciones 2 y 5 mediante Western blot. Al igual que ocurre en CI, en el hipocampo ocurre un incremento de la subunidades NR1 y NR2A en la fracción enriquecida en microdominios de membrana, mientras que no se detecta cambios en la fracción 5 (Figura 14A). Sin embargo, la concentración de la subunidad NR2B en ninguna de las fracciones cambia con el entrenamiento. Lo cual demuestra que durante el aprendizaje espacial existe una translocación de receptores NMDA en ambas estructuras, sin embargo la composición de subunidades del receptor es diferencial. En la CI se translocan receptores compuestos de subunidades NR1, NR2A y NR2B, mientras que en el hipocampo los receptores que son reclutados están compuestos solo por subunidades NR1 y NR2A.

Para analizar la especificidad de la translocación del receptor a los microdominios lipídicos con respecto a las regiones cerebrales se analizó la concentración de receptor NMDA en la corteza parietal una estructura donde no existen reportes de su participación el aprendizaje espacial. Como se esperaba, no existe un reclutamiento de este receptor en la corteza parietal, ya que no hay diferencias entre las ratas entrenadas y los controles de nado (Figura 14B).

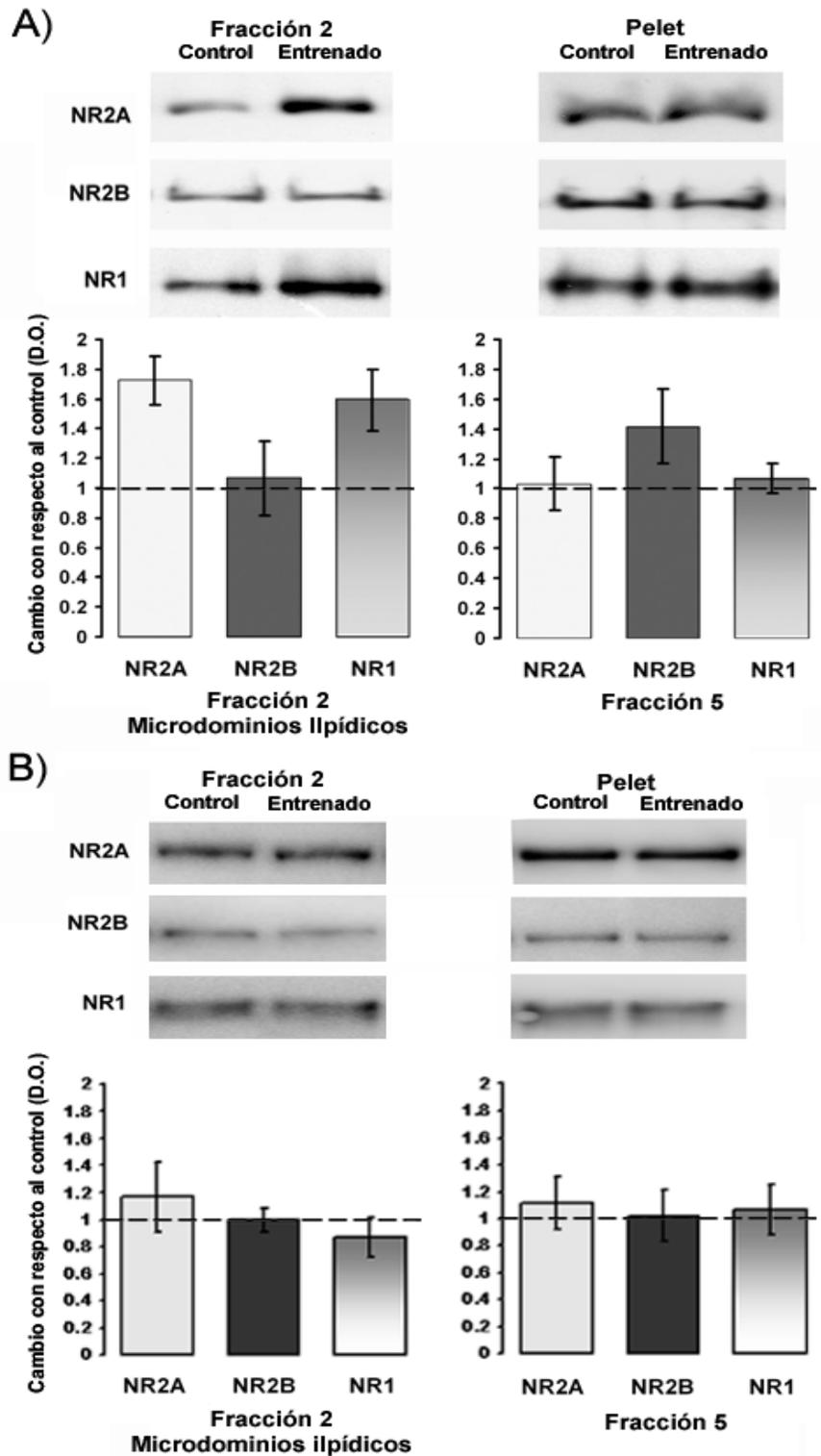


Figura 14. Efecto del entrenamiento en la asociación del receptor NMDA con los microdominios lipídicos en el hipocampo y en corteza parietal. Los microdominios de membrana fueron aislados a partir de fracción insoluble del hipocampo (A) y de corteza parietal (B) (1 y 2 animales por muestra

respectivamente). En las gráficas se muestra el análisis mediante Western blot de las fracciones 2 y 5 para detectar las subunidades del receptor NMDA (5 (hipocampo) y 8 (parietal) experimentos independientes), los resultados se muestran como promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al control (densidad óptica del entrenado / control). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

La supresión génica de PSD-95 no redujo la asociación del receptor NMDA con los microdominios lipídicos

Con el objetivo de analizar la contribución de la proteína PSD-95 en la localización del receptor NMDA en los microdominios de membrana se aislaron los microdominios lipídicos a partir de la fracción insoluble obtenida de corteza de ratones silvestres y ratones mutantes a los cuales se les suprimió la expresión de la proteína PSD-95 ¹¹⁸.

Para este experimento a diferencia de los realizados en ratas se colectaron 5 fracciones del gradiente más el precipitado, el cual fue resuspendido por sonicación en 1ml de amortiguador en el cual se prepara el gradiente. Cuando el precipitado se aísla de la fracción 5, la mayor parte de receptores de glutamato y de PSD95 se localiza en el precipitado. La fracción 5 está mayormente enriquecida en proteínas de citoesqueleto como actina lo cual concuerda con lo reportado ⁶³. La concentración de PSD-95 y receptores NMDA en este precipitado es muy alta por lo que es posible considerarlo como una fracción enriquecida en densidad postsináptica, ya que frecuentemente las densidades postsinápticas se aíslan mediante precipitación como una fracción insoluble. La figura 15 también muestra que la proteína Src, que fosforila al receptor NMDA, se localiza casi exclusivamente en los microdominios de membrana (Figura 15).

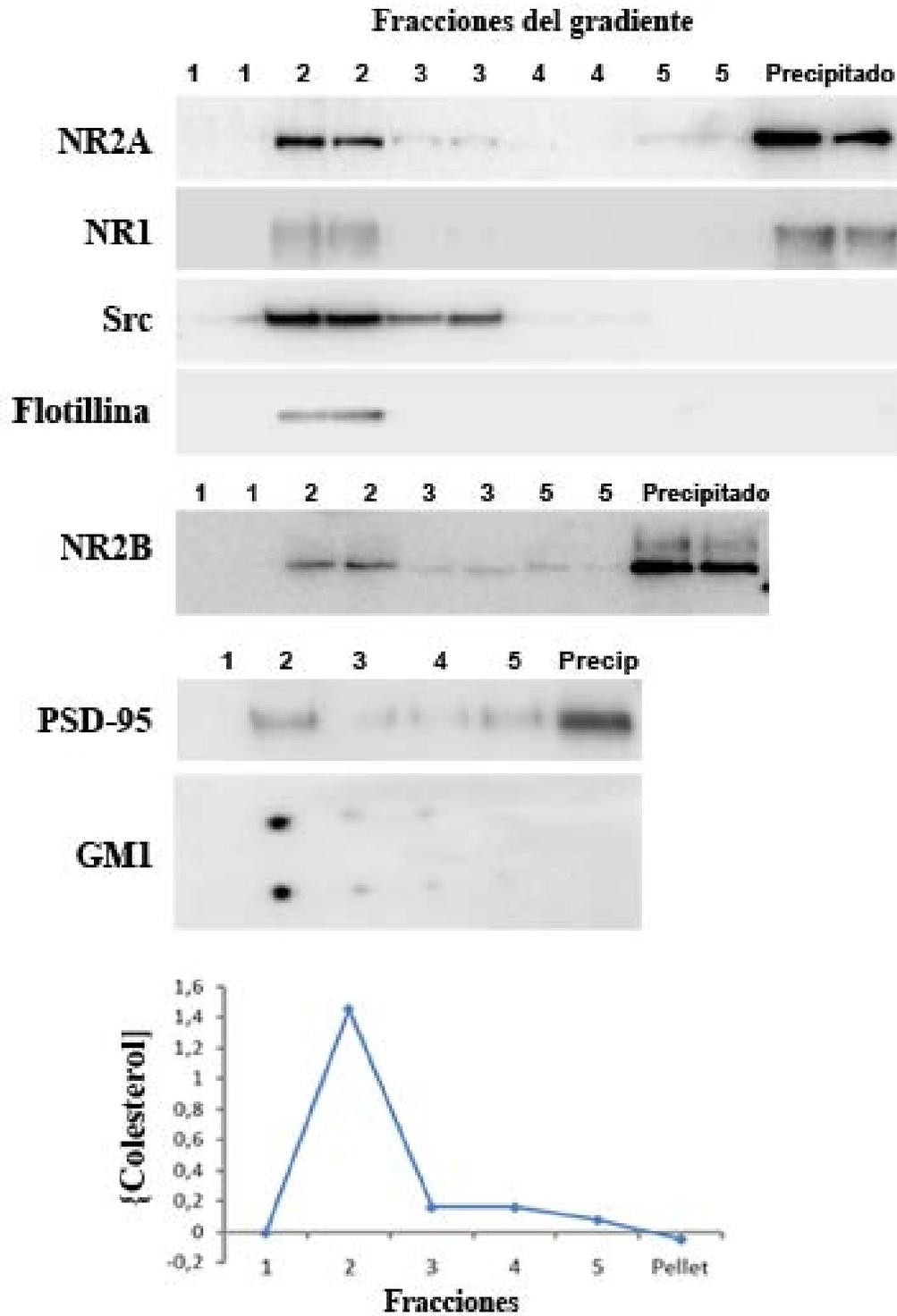


Figura 15. Distribución de las proteínas en el gradiente de sacarosa y el precipitado. Análisis mediante Western blot de las fracciones de dos gradientes preparados a partir de dos ratones silvestres independientes y análisis colorimétrico de distribución del colesterol.

Debido a que el receptor NMDA principalmente se localiza en la fracción 2 y en el precipitado se analizó la concentración de PSD-95 y de las subunidades NR1, NR2A y NR2B en estas fracciones mediante un Western blot específico para cada proteína. Como se puede observar en la figura 16, la ausencia de PSD-95 incrementa ligeramente la concentración de receptor NMDA compuesto por subunidades NR1 y NR2A, la concentración de NR2B no cambia. El inmunoblot para detectar PSD-95 muestra la ausencia de esta proteína en los ratones mutantes y adicionalmente muestra el incremento de otra proteína de alrededor de 100kD que de manera inespecífica reconoce el anticuerpo primario utilizado. Esta proteína es PSD-93 (se muestra más adelante en figura 17) otro miembro de la familia MAGUK, ya que por su similitud es frecuente que los anticuerpos hechos para detectar PSD-95 detecten también otras proteínas de la misma familia. El incremento de esta proteína de aproximadamente 100kD en los microdominios podría estar relacionado con el aumento de NR2A y NR1 ya que en ausencia de PSD-95, otras proteínas de la familia MAGUK principalmente PSD-93, pueden cumplir las funciones de PSD-95, entre ellas la formación de agregados de los receptores ¹¹⁹. Adicionalmente se midió la concentración de proteína, colesterol y GM1 en la fracción 2 del gradiente y en el precipitado, no se observaron cambios significativos en estos parámetros entre los ratones silvestres y los mutantes (Figura 16A). Como ya se mencionó anteriormente la fracción 2 está altamente enriquecida en colesterol y GM1, el resto de las fracciones no tienen cantidades detectables de estos lípidos.

En la figura 16C se muestra que no existen diferencias en la concentración total de receptor NMDA en el homogenizado crudo de los mismos ratones a partir de los cuales se aislaron los microdominios lipídicos.

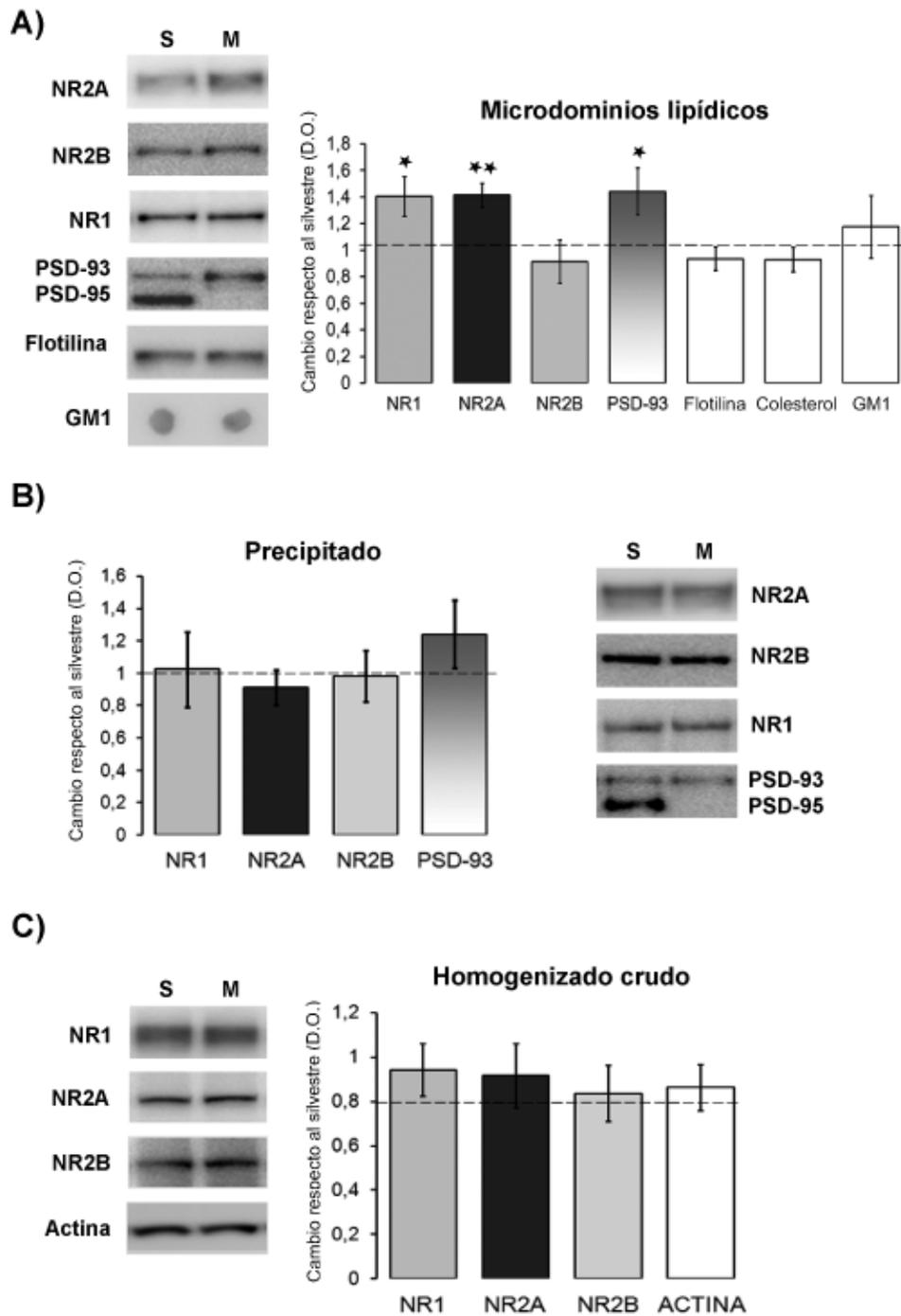


Figura 16. Efecto de la supresión de PSD-95 en la asociación del receptor NMDA con microdominios lipídicos. Los microdominios fueron aislados a partir de fracción insoluble de la corteza (1 animal por muestra) de animales PSD-95 ^{-/-} y silvestres, se extrajeron 5 fracciones y el precipitado del gradiente de sacarosa. A) Análisis mediante Western blot con la misma cantidad de proteínas del control y el silvestre en fracción 2 para detectar las subunidades del receptor NMDA, PSD-95 y PSD-93 (El anticuerpo utilizado para detectar PSD-95 también se une a PSD-93).

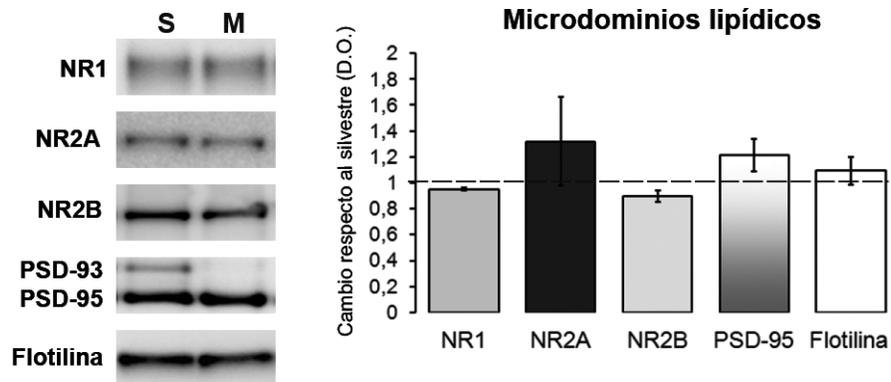
También se muestra el dot blot para detectar GM1. La gráfica muestra análisis densitométrico de las bandas de los blots y el análisis de la concentración de colesterol de 5 experimentos independientes, los resultados se muestran como promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al control (densidad óptica del PSD-95 +/- entre el silvestre). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Análisis mediante Western blot de las subunidades del receptor NMDA, PSD-93 y actina en el precipitado del gradiente (B) y en el homogenizado crudo (C). Las gráficas muestran el análisis densitométrico de las bandas como el promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al silvestre.

La supresión génica de PSD-93 no disminuyó la asociación del receptor NMDA con los microdominios lipídicos

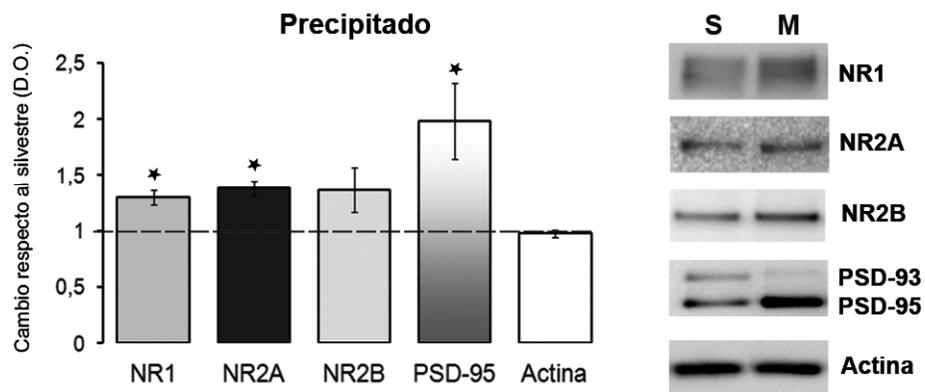
Como se mostró anteriormente la supresión de PSD-95 no produce una disminución de la concentración de receptor NMDA en los microdominios lipídicos, sino por el contrario lo que se observó fue un ligero aumento de receptores compuestos por NR1 y NR2A, con un aumento similar de PSD-93 en los microdominios. Estos resultados sugerían que PSD-93 podría tener un papel importante en la asociación del receptor NMDA a los microdominios de membrana por lo cual aumenta la concentración de receptor al incrementarse su presencia en estos microdominios. Por lo tanto se decidió analizar la concentración de receptor NMDA en los microdominios de ratones mutantes que carecen de esta proteína (PSD-93 -/-). Se aislaron los microdominios lipídicos a partir de la fracción insoluble obtenida de corteza de ratones silvestres y ratones PSD-93 -/-. La concentración de PSD-93, PSD-95, flotillina-1 y de las subunidades NR1, NR2A y NR2B, en la fracción 2 fue analizada mediante un Western blot. Como se puede observar en la figura 17, la ausencia de PSD-93 no produce cambios en los microdominios de membrana, mientras que en el precipitado incrementa la concentración de PSD-95 y receptor NMDA (NR1/NR2B). El incremento en PSD-95 es mucho mayor,

aproximadamente 70%, mientras que la concentración del receptor se incrementa aproximadamente en un 25%. En la figura 17C se muestra que no existieron diferencias en la concentración total de receptor NMDA en el homogenizado crudo de los mismos ratones a partir de los cuales se aislaron los microdominios lipídicos.

A)



B)



C)

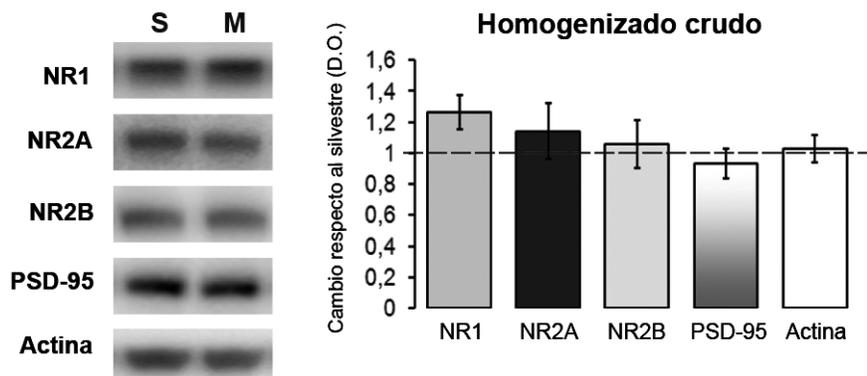


Figura 17. Efecto de la supresión de PSD-93 en la asociación del receptor NMDA con microdominios lipídicos. Los microdominios fueron aislados a partir de la fracción insoluble de la corteza (1 animal por muestra) de animales PSD-93 $-/-$ y silvestres, se extrajeron 5 fracciones y el precipitado del gradiente de sacarosa. Análisis con la misma cantidad de proteínas de la fracción 2 (A) y el precipitado (B) de las subunidades del receptor NMDA, PSD-95 (El anticuerpo utilizado para detectar PSD-95 también se une a PSD-93), flotillina o actina mediante Western blot. Las gráficas muestran el análisis densitométrico de las bandas de los blots de 4 experimentos independientes, los resultados se muestran como promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al control (densidad óptica del PSD-93/ $-/-$ entre el silvestre). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. C) Análisis mediante Western blot de las subunidades del receptor NMDA, PSD-95 y actina en el homogenizado crudo. La gráfica muestra el análisis densitométrico de las bandas como el promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al silvestre.

La eliminación de la valina 1482 de la subunidad NR2B afectó la asociación del receptor NMDA con los microdominios.

Se ha reportado ampliamente que existe una redundancia de funciones entre las proteínas de la familia MAGUK por lo que una pueden ser sustituida por las otras, la supresión de una de ellas se ha reportado que incrementa la expresión de otras ^{118, 119}. En este trabajo también se demuestra que la supresión de PSD-95 incrementa la cantidad de PSD-93 en los microdominios mientras que la supresión de PSD-93 incrementa la cantidad de PSD-95 en el precipitado enriquecido en densidades postsinápticas. Debido a ello se decidió analizar el efecto de la eliminación de la valina 1482 la cual es parte la secuencia de unión a dominios PDZ. Como se mencionó anteriormente, el receptor NMDA interactúa con las proteínas de la familia MAGUK a través de este dominio de unión, el cual está compuesto por la secuencia SDV en el carboxilo terminal, la mutación de uno de los tres aminoácidos dafecta su interacción con los dominios PDZ.

Se aislaron los microdominios lipídicos a partir de la fracción insoluble obtenida de la corteza de ratones silvestres y ratones mutantes que tienen una mutación que elimina la valina 1482 (DV). Se colectaron 5 fracciones del gradiente y el precipitado. La concentración de las subunidades NR1, NR2A, NR2B y PSD-95 en cada fracción fue analizada mediante un Western blot específico para cada proteína examinando en el gel la misma cantidad de proteína de la fracción 2 y el precipitado.

Como se puede observar en la figura 18, la ausencia de la valina disminuyó aproximadamente 40% la concentración de subunidades NR1 y NR2B del receptor NMDA en los microdominios lipídicos, sin embargo también se observa una disminución de alrededor de 30% de las subunidades NR1 y NR2A en el precipitado que está enriquecido principalmente en densidades postsinápticas, interesantemente la subunidad NR2A aumenta aproximadamente en la misma proporción en el precipitado, pero no en los microdominios (Figura 18A y B). Sin embargo, cuando se midió la concentración de proteínas de las fracciones 2 del gradiente para analizar mediante el Western blot la misma cantidad de proteínas, nos dimos cuenta que la concentración de proteína total en el mismo volumen de muestra era mayor en los ratones mutantes que los controles. También se midió la concentración de colesterol y GM1, encontramos diferencia significativa en la concentración de los tres parámetros en las fracciones 2 (microdominios lipídicos). Los ratones mutantes tuvieron alrededor de 30% más que los ratones silvestres, mientras que no hay diferencia significativa en la concentración de proteína total en el precipitado o en la fracción 5. La cantidad de colesterol y GM1 no es detectable en el precipitado ni en la fracción 5, por lo cual, se midió en la fracción soluble y se observó que la concentración de colesterol y GM1 no se afectan por la mutación.

También se midió la cantidad de colesterol en la fracción insoluble a partir de la cual se separan los microdominios, en esta fracción también se detectó un cambio significativo aunque un poco menor que en la fracción de microdominios lipídicos (Figura 18C). Estos resultados inesperados indican que la mutación de la valina terminal incrementa la concentración total de microdominios lipídicos que fueron aislados por el gradiente de sacarosa.

El incremento en la concentración de microdominios causó que la cantidad total de receptor NMDA en la fracción 2 permanezca similar entre los ratones silvestres y los mutantes, aunque su concentración con respecto a la cantidad de proteínas de los microdominios sea menor en los ratones mutantes.

Se midió también la concentración total de receptor NMDA en el homogenizado crudo a partir de los cuales se aislaron los microdominios lipídicos. Se detectó una ligera pero significativa disminución de aproximadamente 20% en los ratones mutantes de las subunidades NR1 y NR2B (Figura 18D).

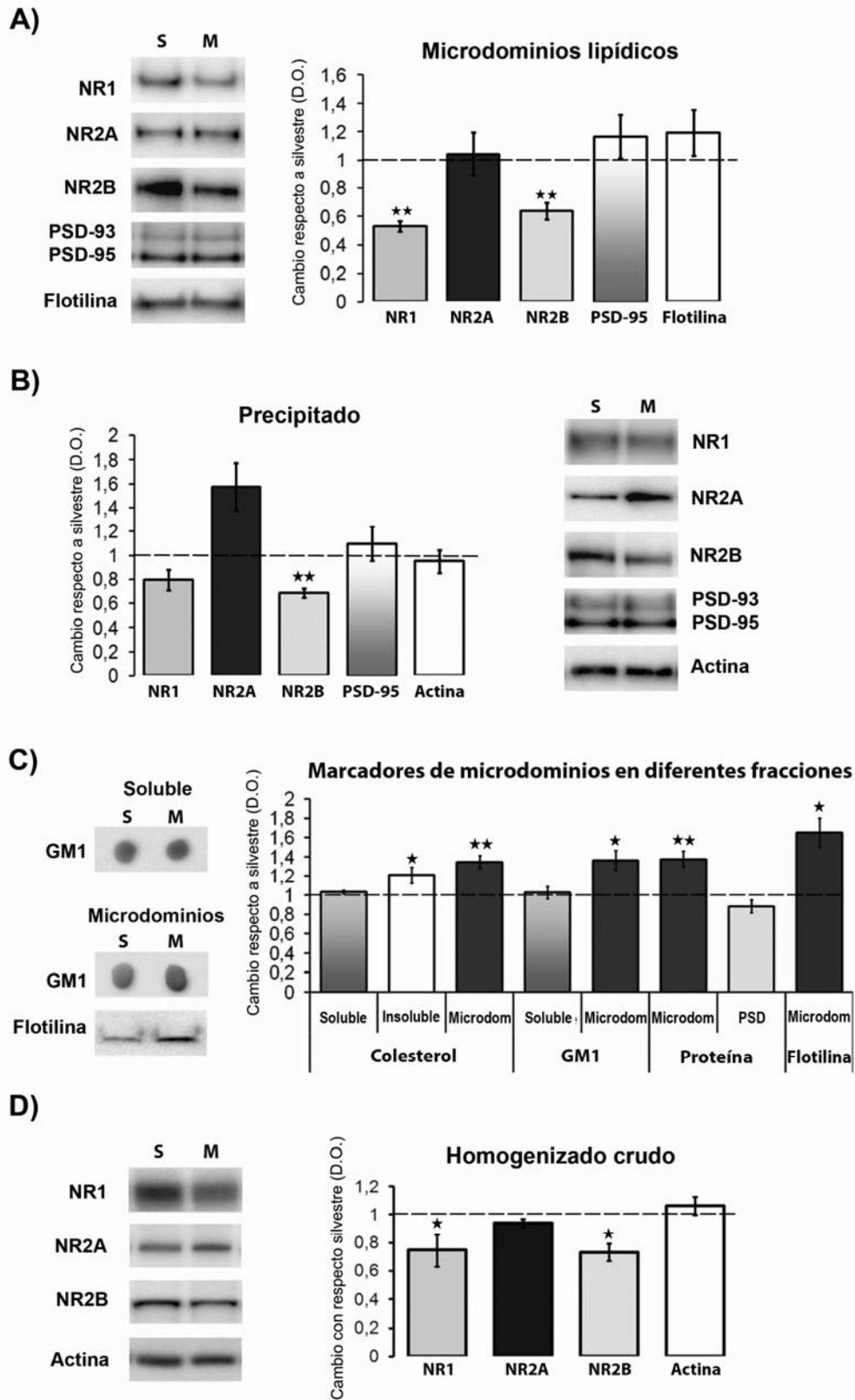


Figura 18. Efecto de la eliminación de la valina 1482 de la subunidad NR2B (DV^{-/-}) en la asociación del receptor NMDA con microdominios lipídicos. Los microdominios fueron aislados a partir de

fracción insoluble de la corteza (1 animal por muestra) de animales DV -/- y silvestres, se extrajeron 5 fracciones y el precipitado del gradiente de sacarosa. A) Análisis mediante Western blot con igual cantidad de proteínas de la fracción 2 y el precipitado (B) para detectar las subunidades del receptor NMDA, PSD-95, flotillina o actina. Las gráficas muestran los análisis densitométricos de 6 experimentos independientes. C) Análisis con el mismo volumen de muestra de GM1 (dotblot), flotillina-1 (Western blot), colesterol (ensayo calorimétrico) proteínas (método de Bradford) en la fracción 2, la fracción soluble y de la fracción insoluble que se obtienen antes de realizar el gradiente de sacarosa. D) Análisis mediante Western blot de las subunidades del receptor NMDA y actina en 20µg homogenizado crudo. Los resultados se muestran como promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al silvestre (densidad óptica del DV -/- entre el silvestre). * $p < 0.05$. * $p < 0.05$.

La eliminación del dominio carboxilo terminal de la subunidades NR2A redujo la asociación de los receptores NMDA con los microdominios lipídicos

Como se mostró anteriormente, la eliminación de la valina de la secuencia de unión a dominios PSD de la subunidad NR2B disminuyó la concentración del receptor NMDA con subunidades NR2B en aproximadamente 40%. Es posible que el receptor NMDA interaccione con las proteínas de la familia MAGUK mediante otro dominio en su carboxilo terminal. Debido a ello, se analizó el efecto de la mutación del carboxilo terminal de las subunidades del receptor NMDA sobre su localización en los microdominios de membrana.

Se aislaron microdominios de membrana a partir de la fracción insoluble del tejido cortical de ratones silvestres y mutantes DC-/- que carecen del dominio carboxilo terminal de la subunidad NR2A. Debido a que los ratones homocigotos que carecen del carboxilo terminal de la subunidad NR2B mueren perinatalmente, no fue posible analizar esta mutación. Como se muestra en la figura 19 los ratones mutantes del carboxilo terminal NR2A-/- tienen una disminución de

aproximadamente 70% de la subunidad NR1, mientras que la concentración de NR2B no cambia significativamente. En el precipitado también existe un cambio en la subunidad NR1, sin embargo este cambio es menor (30%). La concentración de proteína total en los microdominios y en el precipitado no cambio al igual que la cantidad de colesterol y gangliósido GM1. No hemos podido detectar la subunidad NR2A en los ratones DC -/- ya que la mayoría de anticuerpos reconocen el carboxilo terminal de la subunidad. Existen algunos anticuerpos comerciales que reconocen el amino terminal, sin embargo se han probado dos de ellos y no se logró detectar a la proteína en ratones silvestres. Sin embargo, debido a la gran disminución de la subunidad NR1 es posible suponer que la subunidad NR2A también debe disminuir en la misma o mayor proporción en los microdominios lipídicos ya que la subunidad NR2B no cambia.

También se midió la concentración de receptor NMDA en el homogenizado crudo a partir del cual los microdominios fueron aislados. Como se muestra en la figura 19C, se detectó una disminución de aproximadamente 30% en la cantidad de NR1.

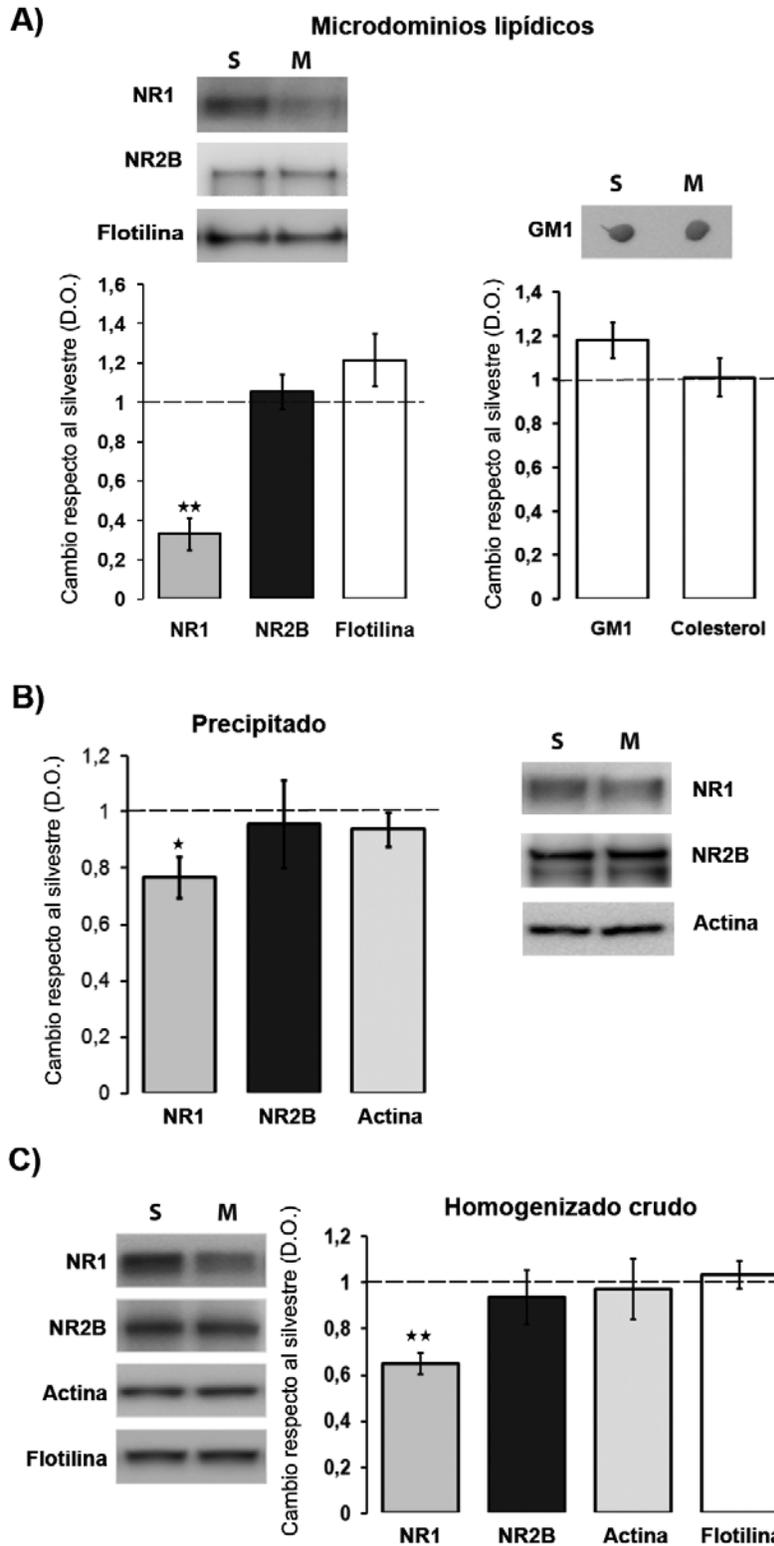


Figura 19. Efecto de la eliminación del carboxilo terminal de la subunidad NR2A (DC $-/-$) en la asociación del receptor NMDA con microdominios lipídicos. Los microdominios fueron aislados a partir de fracción insoluble de la corteza (1 animal por muestra) de animales DC $-/-$ y silvestres, se

extrajeron 5 fracciones y el precipitado del gradiente de sacarosa. A) Análisis mediante Western blot con la misma cantidad de proteínas del control y el silvestre en fracción 2 para detectar las subunidades del receptor NMDA y flotilina. En el lado derecho se muestra el dot blot para detectar GM1 y el análisis del colesterol a partir del mismo volumen de muestra. La gráfica muestra análisis densitométrico de 4 experimentos independientes. B) Análisis mediante Western blot de las subunidades del receptor NMDA y actina en el precipitado del gradiente y en el homogenizado crudo (C). La gráfica muestran el análisis densitométrico de las bandas como promedio (\pm error estándar) del cambio con respecto al control (densidad óptica del DV -/- entre el silvestre). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

PSD-95 KO						
	NR1	NR2A	NR2B	PSD-93	ACTINA	FLOT
Microdominios	1.40	1.41	0.91	1.44		0.93
PSD (Precipitado)	1.03	0.91	0.98	1.24		
Total	1.06	1.09	1.20	1.16	0.90	

PSD-93 KO						
	NR1	NR2A	NR2B	PSD-95	ACTINA	FLOT
Microdominios	0.90	1.18	0.84	1.12		1.09
PSD (Precipitado)	1.44	1.42	1.40	2.02	0.97	
Total	1.26	1.14	1.06		1.03	0.95

NR2B DV						
	NR1	NR2A	NR2B	PSD-95	ACTINA	FLOT
Microdominios	0.53	1.04	0.64	1.17		1.12
PSD (Precipitado)	0.79	1.57	0.68	1.09	1.05	
Total	0.79	0.94	0.73	1.06	1.06	

NR2A DC						
	NR1	NR2A	NR2B	PSD-95	ACTINA	FLOT
Microdominios	0.33		1.05			1.22
PSD (Precipitado)	0.77		0.96		0.91	
Total	0.65		0.94		0.97	1.03

Tabla 1. Resumen de resultados de los ratones mutantes. Resultados del análisis densitométrico de los blots donde se analizaron las proteínas indicadas en la fracción 2 (microdominios), en el precipitado (PSD) de los gradientes de sacarosa y en el homogenizado total. Los resultados se expresan como promedio del cambio con respecto a los ratones silvestres, en rojo se muestran los incrementos y en azul los decrementos estadísticamente significativos.

Discusión y conclusiones

Nuestros resultados muestran que en la CI, el entrenamiento en el laberinto acuático induce translocación de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor NMDA hacia los microdominios lipídicos. Este entrenamiento no cambia la síntesis de las subunidades o la concentración de microdominios aislados. El incremento de receptores en los microdominios lipídicos podría ser el resultado de la inserción de receptores a la membrana provenientes de pozas intracelulares o del desplazamiento lateral desde regiones solubles de la membrana hacia los microdominios lipídicos. Sin embargo, cuando se aislaron los sinaptosomas, los cuales conservan la membrana y densidad postsináptica, no se observó un incremento de ninguna de las subunidades del receptor NMDA en la membrana sinaptosomal, por lo que se puede concluir que el entrenamiento no indujo inserción de nuevos receptores en la sinapsis. Sin embargo en la misma fracción sinaptosomal se observó un incremento de la concentración receptor NMDA en los microdominios lipídicos con un decremento en la densidad postsináptica. Estos resultados sugieren que los receptores NMDA reclutados en los microdominios provienen de la región de la membrana soluble asociada a la densidad postsináptica.

Nosotros usamos el método descrito por Besshoh con algunas modificaciones para aislar los sinaptosomas y los microdominios lipídicos de la membrana sináptica. Como reportó Besshoh y colaboradores, los microdominios preparados de sinaptosomas son heterogéneos, potencialmente contienen microdominios derivados de regiones postsinápticas, perisinápticas y extrasinápticas así como también de la terminal presináptica, por lo que es difícil

determinar el origen exacto de los receptores NMDA que son reclutados en los microdominios.

Adicionalmente, en nuestro trabajo se demuestra que un día de entrenamiento en el laberinto acuático induce en la CI la fosforilación de la tirosina 1427 de la subunidad NR2B, sin que se observe una diferencia en la fosforilación total en tirosinas del receptor. En el receptor NMDA se han descubierto 3 sitios de fosforilación en tirosina en la subunidad NR2B y 3 en la subunidad NR2A. La regulación de la fosforilación de estos sitios se sabe que ocurre de manera diferencial y que puede ser mediada por diferentes cinasas ¹²⁰. Sin embargo la fosforilación en tirosinas de la subunidad NR2B está al menos parcialmente mediada por una cascada de señalización que involucra la activación secuencial de PKC, Pyk2 y de la cinasas de la familia Src ³⁷. Nakazawa y colaboradores (2002) identificaron a la tirosina 1472 de NR2B como el principal sitio *in vitro* de fosforilación por la cinasa fyn (miembro de la familia de cinasas Src). Estos investigadores también reportaron que la fosforilación en este residuo se incrementa después de la inducción de LTP en el hipocampo, lo cual sugiere que está involucrado en procesos de plasticidad sináptica ¹⁹.

Se ha reportado que esta fosforilación posiblemente no regula la conductividad del canal del receptor ¹²¹. Recientemente demostraron que la mutación en la tirosina 1472 causa la localización del receptor NMDA en la región periférica de la sinapsis y también afecta la formación de la memoria ²⁰. El grupo de Besshoh (2005) reportó que después del tratamiento de isquemia y reperfusión la fosforilación de la tirosina 1472 se incrementaba tanto en la densidad postsináptica como en los microdominios. Sin embargo el incremento fue mayor en los receptores asociados al microdominio. Nosotros no logramos detectar la

fosforilación de la tirosina 1472 dentro de los microdominios debido a que para detectar la fosforilación de este residuo, tuvimos que realizar una la inmunoprecipitación de la subunidad NR2B antes de realizar el Western blot. Lo cual no se logró realizar en la fracción de microdominios lipídicos. Sin embargo, analizando la fosforilación en lisado crudo, encontramos que en la CI el entrenamiento induce la fosforilación tirosina 1472 y la translocación de la subunidad NR2B a los microdominios y mientras que en el hipocampo el entrenamiento no induce la fosforilación de esta tirosina ni la translocación de la subunidad NR2B. Tomando en cuenta estos datos en conjunto con lo reportado por Besshoh, se puede concluir que la fosforilación de la tirosina 1472 correlaciona con su localización en los microdominios de membrana. Sin embargo no se puede concluir si esta fosforilación es una señal que induce la translocación del receptor o es una consecuencia de que el receptor se relocalice en este microdominio y por lo tanto se encuentre en mayor contacto con la cinasa fyn que lo fosforila, ya que esta cinasa está concentrada en estos microdominios.

Nuestros resultados son consistentes con un modelo que implica una mayor eficiencia en la señalización intracelular mediada por el receptor NMDA cuanto este receptor se incorpora a los microdominios. Estos cambios en la eficiencia de la señalización mediada por el receptor NMDA conducirían al incremento en la fuerza de la actividad sináptica lo cual se cree que subyace los eventos de plasticidad sináptica, entre ellos la formación de la memoria.

Por otra parte, el hecho que el entrenamiento espacial reclute hacia los microdominios a la subunidad NR2A y no a la subunidad NR2B sugiere que dentro de los microdominios las proporciones de los subunidades que forman a los receptores NMDA cambian con el entrenamiento. Lo cual cambiaría las

características de la corriente de Ca^{2+} que entra través del receptor exclusivamente en esta región de la membrana. Este resultado también sugiere que la función de las subunidades NR2 es diferente en las diversas estructuras que están involucradas en el aprendizaje de una tarea espacial. Es posible que la subunidad NR2B intervenga en el hipocampo durante este aprendizaje, por lo cual no se induce su fosforilación ni su translocación a los microdominios. Liu y colaboradores (2004) mostraron que el bloqueo selectivo de la subunidad NR2B en el hipocampo evita la inducción de LTD sin afectar LTP, por el contrario, la inhibición de NR2A bloquea la inducción de LTP pero no la de LTD ¹²². Sin embargo, existen otros estudios donde se demuestra la participación de ambas subunidades en la inducción de LTP en ratas de dos semanas de edad ¹²³ y en ratones de 28 días ¹²⁴. Adicionalmente un estudio realizado con oligonucleótidos antisentido para disminuir la expresión de la subunidad NR2B demostró que el tratamiento en el hipocampo de ratas evita la inducción de LTP y afecta el aprendizaje espacial ¹²⁵. En la corteza también se ha observado la intervención de ambas subunidades durante LTP y condicionamiento de miedo contextual ¹²⁶. Esta variabilidad en los datos muestra que la participación de la subunidad NR2B durante la inducción de plasticidad sináptica cambia con el modelo y protocolo de estimulación utilizado. Con el protocolo de entrenamiento utilizado en este trabajo (solo 10 ensayos en una sesión) los resultados sugieren que en el hipocampo no es necesario un reclutamiento ni fosforilación de la subunidad NR2B. Sin embargo en CI si es necesario el reclutamiento y fosforilación de ambas subunidades NR2. Teóricamente el reclutamiento de subunidades NR2B permitiría una mayor entrada de Ca^{2+} en los microdominios que el reclutamiento de subunidades NR2A, ya que esta última tiene una cinética de desactivación más rápida y una menor

conductancia que la subunidad NR2B¹²⁷⁻¹²⁹. Posiblemente en la corteza es necesaria un mayor incremento de calcio en los microdominios que en el hipocampo, ya que es probable que el hipocampo sea más susceptible a sufrir cambios plásticos. La intensidad de la estimulación requerida para inducir LTP en el hipocampo generalmente es menor a la requerida en la corteza^{122, 130}. Por esta razón es posible que en la CI se requiera la colaboración de las subunidades NR2B con mayor conductancia al Ca²⁺ para inducir el cambio plástico, mientras que en el hipocampo la participación de las subunidades NR2A es suficiente. Sin embargo como se muestra en este trabajo después 5 días de entrenamiento la fosforilación total en tirosina de la subunidad NR2B si se incrementa en el hipocampo (la fosforilación de la tirosina 1472 no fue medida). En la CI la fosforilación total no cambió con 5 días de entrenamiento. Como se mencionó anteriormente al medir la fosforilación total de la subunidad NR2B mediante inmunoprecipitación de la subunidad y Western blot contra tirosinas fosforiladas, se detecta la fosforilación de todos los residuos que tiene la subunidad NR2B y de los residuos de la subunidad NR2A que co-precipita con la NR2B. Por lo tanto, es difícil interpretar que ocurre cuando se detecta un incremento en la fosforilación con este tipo de método, pues como ya se ha reportado, la fosforilación de los diferentes residuos de las subunidades NR2 es diferente en respuesta a un mismo estímulo, mientras que la fosforilación de un residuo puede incrementarse otro disminuye, además de que la fosforilación de cada residuo tiene un efecto diferente en el receptor. Por lo tanto se concluye que el uso de un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas para medir la fosforilación del receptor NMDA no es de utilidad para estudiar qué está ocurriendo con la fosforilación del receptor.

Se desconoce si durante el entrenamiento en el laberinto acuático ocurre el reclutamiento de otras proteínas a los microdominios de membrana. PSD-95 se une a varios receptores, entre ellos los AMPA, es posible que el reclutamiento de PSD-95 a los microdominios permita la translocación de otras proteínas. Sin embargo este trabajo muestra la especificidad del reclutamiento de los receptores a los microdominios de membrana. No todas las proteínas capaces de unirse a PSD95 son reclutadas a los microdominios, ya que en hipocampo son reclutadas durante el entrenamiento las subunidades NR2A y NR1 mientras que la subunidad NR2B permanece estable. En corteza parietal en la cual no se ha reportado la intervención de los receptores NMDA en el aprendizaje espacial no ocurre esta translocación. Otros datos del laboratorio que no han sido publicados muestran que en hipocampo la cinasa dependiente de calcio PKC también se recluta a microdominios de membrana y que en CI no ocurre esta translocación. Todos estos resultados muestran la especificidad del reclutamiento de proteínas a los microdominios de membrana durante el entrenamiento en el laberinto acuático.

Uno de los puntos controversiales en el estudio de los microdominios de membrana es que las porciones de las proteínas aisladas con los microdominios de membrana no son constantes. Besshoh y colaboradores reportaron aproximadamente 60% de la población de proteínas PSD-95 aislada en los microdominios de membrana, mientras que estudios previos han reportado solo un 10% de esta proteína asociada a microdominios lipídicos^{60, 61, 67, 71}. Las razones de esta variación no se conocen, sin embargo se ha postulado que están relacionadas con las diferentes condiciones de la extracción, particularmente a la razón entre la concentración de proteína y la de detergente. El incremento en la concentración de

detergente incrementa la solubilización de las proteínas y rompe las interacciones débiles entre ellas y los microdominios lipídicos ¹³¹. Besshoh y colaboradores utilizaron una razón 1:1 entre el detergente y la proteína, en este trabajo para aislar los microdominios realizamos una mayor solubilización utilizando un radio aproximado de 0.2:1 (0.35:1 en los experimentos con ratones) para aislar los microdominios a partir de fracción insoluble y 0.06:1 para los microdominios sinápticos. Por lo tanto, condiciones utilizadas en este trabajo fueron de mayor astringencia lo cual podría explicar que se obtuviera una proporción de proteínas asociadas a los microdominios de membrana mucho menor a las reportadas por Besshoh, Sin embargo, estas proteínas deben estar fuertemente asociadas a los microdominios.

Los receptores NMDA no son proteínas aciladas, así que para asociarse a los microdominios de membrana es probable que requieran asociarse a otra proteína que se localice en estos microdominios. El receptor NMDA está fuertemente asociada a proteínas de andamiaje de la familia MAGUK, PSD-95 es el más abundante miembro de esta familia. PSD-95 al igual que el receptor NMDA se transloca a los microdominios de membrana durante el entrenamiento en el laberinto acuático. Esta proteína es importante para la localización sináptica y la señalización del receptor NMDA, tiene dos cisteínas palmitoiladas en la región N-terminal que le permiten asociarse con los microdominios lipídicos ^{132, 133}. Varios estudios han mostrado que la región C-terminal T/SXV de las subunidades NR2A y NR2B puede unirse directamente con los dominios PDZ de PSD-95. Hay varios trabajos que sugieren que esta interacción induce agregamiento postsináptico del los receptores NMDA. ^{37, 38, 134} y que la palmitoilación de PSD-95 es esencial para la formación de estos agregados. No puede ser reemplazada por otros motivos de

asociación con membrana, lo cual sugiere que la interacción con los microdominios lipídicos está involucrada en la formación de agregados NMDAR-PSD-95^{132, 133}. La participación de microdominios en la formación de agregados de otros receptores ya ha sido estudiada^{135, 136}. La formación de agregados de receptores de acetilcolina requiere la asociación con rapsyna, una proteína miristoilada de la placa neuromuscular^{22, 137} que se localiza constitutivamente en los microdominios y recluta al receptor de acetilcolina en respuesta a agrina. La disrupción de los microdominios inhibe la formación de agregados de este receptor¹³⁸.

En el cerebro, los mecanismos que involucran la formación de agregados y la translocación a los microdominios ha sido poco estudiada. Sin embargo, en sinapsis glutamatérgicas PSD-95 podría ejercer una función equivalente a la rapsyna en la unión neuromuscular. PSD-95 podría ser responsable de la asociación del receptor NMDA con los microdominios pues se sabe que es capaz de inducir formación de agregados y reclutamiento a microdominios de otras proteínas no aciladas. Se ha reportado que la co-expresión de PSD-95 incrementa la formación de agregados y la asociación con microdominios del canal dependiente de voltaje Kv1.4 y del receptor para neuroregulina ErbB4. La supresión del dominio de unión a PSD-95 o de la palmitoilación de esta última elimina este reclutamiento⁶⁰. Tomado en cuenta esta evidencia, nuestros resultados sugerían que el reclutamiento de PSD-95 durante el aprendizaje espacial causa reclutamiento del receptor NMDA.

El doctor Seth Grant en el Reino Unido reportó que ratones mutantes que carecen de PSD-95 tienen deficiencia en el aprendizaje de la tarea en el laberinto acuático de Morris^{118, 139}. Sin embargo estos ratones tienen la misma concentración de receptor NMDA en la sinapsis. Como se muestra en la figura 16

se analizó en estos ratones la concentración de las subunidades del receptor NMDA en los microdominios lipídicos. Los microdominios fueron aislados a partir de fracción insoluble de toda la corteza del ratón. Debido al tamaño del cerebro de los ratones en comparación con las ratas no fue posible aislarlos a partir de CI, ya que se hubiera requerido de aproximadamente 6 ratones mutantes por muestra. La figura 16 indica que estos ratones que carecen de PSD-95 tienen un ligero incremento en la concentración de NR2A y NR1 en los microdominios de membrana, la concentración de NR2B no cambia. Estos resultados sugieren que PSD-95 no interviene en la asociación del receptor NMDA a los microdominios de membrana. Sin embargo, se ha reportado que en ausencia de uno de los miembros de familia MAGUK, los otros miembros pueden tomar su función a lo que se le llama redundancia de funciones ^{118, 119}. En general las supresiones genéticas de miembros de la familia MAGUK tienen efectos mínimos en la transmisión sináptica basal o en la inducción de LTP. Este mutante que carece de PSD-95 funcional tiene defectos mínimos en la transmisión sináptica basal, solo un LTP incrementado y ausencia de LTD ¹¹⁸. Los mutantes de PSD-93 no tienen defectos detectables en la estructura o función de la sinapsis, en la transmisión sináptica basal o en LTP ¹⁴⁰.

Las proteínas de la familia MAGUK comparten una estructura modular semejante con 5 dominios de interacción proteína-proteína; específicamente, tres dominios N-terminal PDZ son seguidos por un dominio SH3 y un dominio enzimáticamente inactivo GK ^{12, 141}. Una diferencia importante entre los miembros es la palmitoilación en la región N terminal. La principal isoforma (alfa) de PSD-95 y PSD-93 tienen dos secuencias de palmitoilación, los cuales son importantes para su destino sináptico, la isoforma beta no lo tiene. La isoforma alfa de SAP-97 también tiene palmitoilaciones, sin embargo esta isoforma se expresa en menor

cantidad que la isoforma beta que no la tiene. La palmitoilación de todas las proteínas de esta familia les permiten formar agregados entre sí y con receptores como el AMPA y el NMDA ^{142, 143}. En cultivo neuronal se ha reportado que el silenciamiento de la expresión de PSD-95 causa un decremento de la transmisión sináptica mediada por receptores AMPA. La expresión heteróloga de las isoformas palmitoiladas de PSD-95 y SAP97 rescata e incrementa en más del doble esta transmisión ¹¹⁹. Por otra parte, el ratón mutante de PSD-95 que analizamos en este trabajo sobrepresa SAP-102 otro de los miembros de la familia MAGUK. Sin embargo esta proteína no esta palmitoilada y no está involucrada en la formación de agregados de receptores. No se ha estudiado la expresión de SAP97, pero existe la posibilidad que la isoforma palmitoilada se encuentre sobreexpresada al igual que SAP-102. La expresión de PSD-93 no se modificó en estos ratones mutantes, sin embargo como se puede ver en la figura 17, la concentración de esta proteína está ligeramente aumentada en los microdominios de membrana, lo cual sugiere que esta PSD-93 podría ser la responsable del incremento en la asociación del receptor con los microdominios en ausencia de PSD-95. Sin embargo en este trabajo también se demuestra que la supresión de PSD-93 no afectó la concentración de receptores NMDA en los microdominios. En la fracción enriquecida en densidades postsinápticas se puede ver un incremento notable de PSD-95 con un incremento discreto 25% de las subunidades NR1 y NR2B del receptor NMDA, pero esto no ocurre en los microdominios. Estos datos podrían indicar que el incremento en la cantidad de alguna proteína de la familia MAGUK causado por la eliminación de otra de ellas causa el incremento de la concentración de receptor NMDA. Esto sucede en los microdominios lipídicos en ausencia de PSD-95 y en la fracción enriquecida en densidades postsinápticas en ausencia de

PSD-93. Sin embargo las razones de este incremento diferencial inducido por la mutación de PSD-95 o PSD-93 es difícil de explicar, es necesario realizar más experimentos para intentar aclarar este punto.

Como se mencionó anteriormente las subunidades NR2 del receptor NMDA se unen a las proteínas de la familia MAGUK mediante la secuencia SDV al final del carboxilo terminal por lo cual se estudio la asociación del receptor NMDA en ratones mutantes que carecen de esta última valina del carboxilo terminal de la subunidad NR2B. Como se muestra en la figura 18, estos ratones tienen una menor concentración de la subunidad NR2B y de la subunidad NR1, con respecto a la concentración de proteína de los microdominios, tanto en los microdominios de membrana como en la fracción enriquecida en densidades postsinápticas. La subunidad NR2A no cambia significativamente en los microdominios y aumenta aproximadamente un 30% en la fracción enriquecida en densidades postsinápticas. Sin embargo, estos ratones también tienen un incremento de 30% en la concentración de proteína total, flotilina, GM1 y colesterol en específicamente en la fracción de microdominios lipídicos. Este incremento de aproximadamente 30% de los microdominios compensa la disminución de aproximadamente 40% en la concentración del receptor en los microdominios. Por lo cual, la cantidad total de receptor en los microdominios es similar entre el los ratones mutantes y los silvestres. Estos resultados sugieren que la mutación de la valina del dominio de unión a PSV causa la disociación entre el receptor y las proteínas de la familia MAGUK lo cual disminuye la concentración de receptor en los microdominios. Sin embargo, el incremento en la concentración de microdominios podría ser un proceso de compensación que incrementa la síntesis de microdominios lipídicos, dando como resultado la nivelación de la cantidad total de receptor NMDA en

comparación con el control. Datos del laboratorio del Dr. Grant, que aun no han sido publicados, indican una disminución en la corrientes posinápticas excitatorias evocadas (EPSC), el tiempo de deactivación es aproximadamente 30% menor, lo cual concuerda con la reducción en la cantidad de NR2B en la sinapsis (Figura 19). El incremento en la concentración de microdominios en los ratones DV podría deberse a que el sistema compensa este decremento en la transmisión sináptica potenciando la señalización intracelular.

En sistema nervioso solo existe un trabajo en el que se observa un aumento en la concentración total microdominios lipídicos. El tratamiento con BDNF en cultivos neuronales por 3 días incrementa la concentración de colesterol y caveolina (marcardor de microdominios) específicamente en los microdominios lipídicos y no en el resto de la membrana. Este incremento fue bloqueado con inhibidores de la síntesis del colesterol. El tratamiento también produce un incremento de proteínas presinápticas específicamente en estos microdominios y de las enzimas que sintetizan el colesterol¹⁴⁴. De forma similar, es posible que la mutación de la valina de la subunidad NR2B del receptor NMDA cause un incremento en las enzimas que sintetizan el colesterol, lo cual será analizado en un futuro próximo.

Como se mencionó anteriormente, la mutación de la valina del dominio de unión a PDZ produjo una disminución de aproximadamente 40% la concentración de subunidad NR2B en los microdominios. Datos aun no publicados del laboratorio del Dr. Grant muestran que la supresión de esta valina, *in vitro*, elimina por completo la interacción del dominio PDZ de las proteínas de la familia MAGUK con la secuencia de unión PSV del receptor. Esto sugiere que la interacción con las proteínas de la familia MAGUK contribuye con la asociación del receptor con los

microdominios sin embargo, no es indispensable, pues la mayor parte del receptor NMDA que se asocia a los microdominios no se ve afectada por esta mutación.

Para estudiar si otras regiones del dominio carboxilo terminal están involucradas en la asociación del receptor con los microdominios, se analizó un mutante que carece del carboxilo terminal de la subunidad NR2A. La mutación del carboxilo terminal de la subunidad NR2B no es viable ¹⁴⁵. Los resultados obtenidos con estos ratones indican que otra región del carboxilo terminal también contribuye a la unión del receptor con los microdominios. La cinasa CAMKII forma agregados en los microdominios y puede reclutar a otras proteínas y hacer más estable el complejo ¹⁴⁶. El receptor NMDA interacciona con CAMKII a través de un dominio que se localiza también en el dominio carboxilo. La autofosforilación de CaMKII induce una unión de alta afinidad con la subunidad NR2B, esta unión depende del segmento que se localiza entre los residuos 1290-1309 de la cola carboxilo terminal así que una secuencia diferente al SPV ^{147, 148}. Esta interacción modula la plasticidad sináptica el aprendizaje espacial ¹⁴⁹. Como se muestra en la figura 19 la supresión del dominio carboxilo terminal disminuye en más de 60% la concentración de NR1 en los microdominios, mientras que la subunidad NR2B no se modifica. Debido a que la mayoría de anticuerpos que reconocen a la subunidad NR2A están hechos para reconocer el extremo carboxilo terminal, no fue posible encontrar un anticuerpo apropiado para identificar la subunidad NR2A sin carboxilo terminal. Sin embargo, debido a que la subunidad NR2B no cambia se puede concluir que la subunidad NR2A sin carboxilo terminal debe estar disminuida en los microdominios lipídicos. En el precipitado enriquecido en densidades postsinápticas se observa una disminución de la subunidad NR1 solo del 30%, similar a la que ocurre en los ratones NR2B que carecen de la valina terminal.

En conjunto, estos resultados indican que la asociación del receptor con los microdominios depende de la interacción de sus subunidades NR2 con otras proteínas mediante su carboxilo terminal sin una importante contribución de la subunidad NR1. Mientras que su asociación con la densidad postsináptica depende en menor medida de la subunidades NR2, ya que la concentración de la subunidad NR1 asociada a la densidad postsináptica se ve poco afectada por las mutaciones que afectan la región carboxilo terminal. Por lo tanto, es probablemente esta asociación dependa en mayor medida de la subunidad NR1. Existen dos trabajos publicados en donde se analizan ratones que carecen de la región carboxilo terminal de las subunidades NR2A, los resultados son controversiales. El grupo del doctor Kohr (2000) ha demostrado en experimentos una disminución mayor al 50% en extractos enriquecidos en densidades postsinápticas. Mientras que el grupo del doctor Seeburg en 1988 (estos ratones fueron los que analizamos en el presente trabajo) usando métodos electrofisiológicos concluye que la mutación del carboxilo terminal no afecta la localización del receptor en la densidad postsináptica ^{145, 150}. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que esta discrepancia se debe a que el grupo del doctor Kohr aisló las densidades postsinápticas basándose en su insolubilidad en tritón 1% por lo que este extracto estaba contaminado con microdominios lipídicos. Así que la diferencia encontrada se debe en gran parte a la disminución del receptor NMDA asociado con los microdominios y no con la densidad postsináptica.

Como se muestra en la tabla 1, las mutaciones que afectan la región carboxilo terminal de las subunidades del receptor o su interacción con las proteínas de la familia MAGUK afectan procesos de plasticidad sináptica (LTP, LTD) sin afectar la transmisión sináptica basal. Interesantemente, el grado en que

la mutación afecta la plasticidad sináptica se correlaciona con el efecto de la mutación en la concentración de receptor NMDA en los microdominios. La supresión de PSD-95 incrementa la concentración de receptor NMDA en los microdominios y también la inducción de LTP; la mutación de la valina de la subunidad NR2B disminuye alrededor de un 40% la concentración de receptor NMDA en los microdominios y aproximadamente 30% la LTP; mientras que la supresión del carboxilo terminal de la subunidad NR2B disminuye en aproximadamente un 60% la LTP y en más de 60% la concentración de receptor en los microdominios. Si tomamos en conjunto estos resultados con el efecto del entrenamiento en la fosforilación y en el reclutamiento del receptor NMDA hacia los microdominios, se puede concluir que el reclutamiento de receptores NMDA en los microdominios lipídicos es un mecanismo de importancia, que regula la funcionalidad del receptor y en particular regula procesos durante la inducción de plasticidad sináptica tales como la formación de la memoria espacial.

Proteína	Gen	Tipo de Mutación	Fondo genético	Transmisión sináptica basal	Estimulación con pulsos pareados	LTP (Estimulación τ)	LTP (Estimulación alta frecuencia)	Reportado en:
PSD-95 - / -	Dlg4	Delección homocigota de los dominios PDZ, Eliminación homocigota	C57BL/6J	35%	111%	214%		Migaud <i>et al</i> 1998 y Carlisle <i>et al</i> 2008
PSD-93 - / -	Dlg2	Eliminación homocigota	C57BL/6J	98%	110%	99%		Carlisle <i>et al</i> 2008
NR2B DV	Grin2b	Eliminación homocigota de la valina carboxilo terminal	C57BL/6J	100%	97%	73%		Aún no ha sido reportado
NR2A DC	Grin2a	Eliminación homocigota del dominios citoplasmico carboxilo terminal	C57BL/6J	107%	93%	43%	47%	Sprengel <i>et al</i> 1998

Tabla 1. Resumen del fenotipo electrofisiológico de los ratones mutantes, Maksym Kopanitsa, Nurudeen Afinowi, Seth Grant, 2007.

Spatial memory formation induces recruitment of NMDA receptor and PSD-95 to synaptic lipid rafts

Ilse Delint-Ramírez, Pamela Salcedo-Tello and Federico Bermudez-Rattoni

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

Abstract

NMDA receptors (NMDARs) activation in the hippocampus and insular cortex is necessary for spatial memory formation. Recent studies suggest that localization of NMDARs to lipid rafts enhance their signalization, since the kinases that phosphorylate its subunits are present in larger proportion in lipid raft membrane microdomains. We sought to determine the possibility that NMDAR translocation to synaptic lipid rafts occurs during plasticity processes such as memory formation. Our results show that water maze training induces a rapid recruitment of NMDAR subunits (NR1, NR2A, NR2B) and PSD-95 to synaptic lipid rafts and decrease in the post-synaptic density plus an increase of NR2B phosphorylation at

tyrosine 1472 in the rat insular cortex. In the hippocampus, spatial training induces selective translocation of NR1 and NR2A subunits to lipid rafts. These results suggest that NMDARs translocate from the soluble fraction of post-synaptic membrane (non-raft PSD) to synaptic lipid raft during spatial memory formation. The recruitment of NMDA receptors and other proteins to lipid rafts could be an important mechanism for increasing the efficiency of synaptic transmission during synaptic plasticity process.

Keywords: lipid raft, memory, NMDA receptor, plasticity, post-synaptic density, trafficking.

J. Neurochem. (2008) **106**, 1658–1668.

NMDA receptors (NMDARs) are a very important trigger for synaptic plasticity (Harris *et al.* 1984; Morris *et al.* 1986; Morris 1989; Philpot *et al.* 2007). Trafficking of NMDA receptors is an important mechanism of NMDAR regulation (Quinlan *et al.* 1999; Heynen *et al.* 2000; Grosshans and Browning 2001; Fong *et al.* 2002; Malinow and Malenka 2002; Tovar and Westbrook 2002; Townsend *et al.* 2003; Groc *et al.* 2004). Recent findings suggest that trafficking to lipid rafts microdomains regulate the NMDARs function (Abulrob *et al.* 2005; Besshoh *et al.* 2005).

Lipid rafts are membrane regions enriched in cholesterol, sphingolipids, glycosphingolipids and acylated proteins. The rafts play an important role in signal transduction, trafficking and sorting of membrane proteins (Suzuki *et al.* 2001; Radeva and Sharom 2004). Rafts are associated with several post-synaptic proteins including NMDA, α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate, and acetylcholine receptors, PSD-95 and kinases known to phosphorylate NMDAR (Becher *et al.* 2001; Suzuki *et al.* 2001; Ma *et al.* 2003; Guirland *et al.* 2004; Besshoh *et al.* 2005). Furthermore, large regions of the post-synaptic density (PSD) are associated with lipid rafts (Ma *et al.* 2003; Mukherjee *et al.* 2003; Abulrob *et al.* 2005; Besshoh *et al.* 2005). Besshoh and collaborators demonstrated that ischemia induced an increase of NMDARs

in PSD associated with soluble membrane, a reduction of receptors in synaptic lipid rafts and a higher increase in tyrosine phosphorylation of NR2 subunits in raft fraction compared with the PSD (Besshoh *et al.* 2005). Another study demonstrated that disruption of lipid rafts induced neuroprotection against NMDA- or glutamate-induced excitotoxicity in cortical cultures (Abulrob *et al.* 2005). This data suggests that the localization of NMDAR inside lipid rafts could increase the efficiency of signal transduction induced by NMDAR activation. Therefore, activity-dependent NMDAR translocation to lipid rafts could be a mechanism of synaptic potentiation during the plasticity process, such as spatial memory formation.

Received April 30, 2008; revised manuscript received June 5, 2008; accepted June 6, 2008.

Address correspondence and reprint requests to Federico Bermudez-Rattoni, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-253 México D.F., 04510, México. E-mail: fbermude@ifc.unam.mx

Abbreviations used: GM1, monosialoganglioside; IC, insular cortex; nAChR, nicotinic acetylcholine receptor; LTP, long term potentiation; NMDAR, NMDA receptor; PSD, post-synaptic density; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis.

Morris water maze has been widely used to test the mechanisms related to spatial memory formation (Morris *et al.* 1986; Eichenbaum *et al.* 1990; Davis *et al.* 1992). Insular cortex (IC) and hippocampus are involved in acquisition and consolidation of water maze task. In this regard, pre- or post-trial injections of NMDAR antagonist in both regions disrupt spatial memory consolidation (Morris *et al.* 1986; Morris 1989; Davis *et al.* 1992; Gutierrez *et al.* 1999). Similarly, human hippocampus and IC increase their activity during spatial-related tasks (Shallice *et al.* 1994; King *et al.* 2002; Bohbot *et al.* 2004).

Therefore, in order to study the possible recruitment of NMDAR to lipid rafts during synaptic plasticity, we analyzed the amount of NMDAR subunits in lipid rafts isolated from IC. We found that water maze training induces an increase of NMDAR subunits in lipid rafts, whereas these subunits are decreased in the post-synaptic densities. We also analyzed the recruitment of NMDARs to lipid rafts in the hippocampus, and our results show that spatial training induces recruitment only of NR1 and NR2A subunits, which suggests a differential regulation of NMDAR subunits among brain regions, during spatial memory formation.

Materials and methods

Water maze training

Male Wistar rats from 260 to 300 g were trained in the Morris Water Maze (Harris *et al.* 1984; Morris *et al.* 1986; Morris 1989; Philpot *et al.* 2007). Animals were trained 10 trials in a water tank with a submerged platform located in a fixed position as previously reported (Ramirez-Amaya *et al.* 1999; Aguilar-Valles *et al.* 2007). On each trial, the animal was introduced from one of the 10 different points into a circular black pool located in a room with dim light (water temperature: 19–20°C). Animals from the trained group (T) were allowed to swim until reaching the invisible 10 cm × 10 cm platform, or manually led to it if the animal failed to find the platform within 60 s; they remained 30 s on the platform and 30 s in a dry cage. Swimming behavior and the time to achieve the platform, on each trial, was recorded. Animals of the swimming control group (C) were immersed 10 times into the tank with no platform or spatial cues, and were allowed to swim the average time registered for the trained group. The animals were decapitated immediately after the last trial with a guillotine in an adjacent room to that containing the tank and a sample of both insular cortices were dissected on ice. The area was cleaned between each sacrifice and bodies removed. We used independent groups of animals for each experiment. Two additional groups trained ($n = 9$) and swimming control rats ($n = 5$), were tested 24 h after training to show memory retention.

Isolation of lipid raft from homogenate tissue (whole cell lipid rafts)

Lipid rafts were prepared from insoluble fraction of homogenate tissue, as described previously by Marta and collaborators (Marta *et al.* 2003) with some modifications. Insular cortices from both

hemispheres of two rats per sample were mixed and homogenized in buffer (0.5 mL of 150 mM NaCl, 25 mM Tris-Cl buffer, pH 7.5, containing 50 mM NaF, 10 mM NaP^2O_7 , 1 mM Sodium orthovanadate, complete protease inhibitors cocktail (Roche, Mannheim, Germany) and 1% Triton X-100. Protein concentration was determined by Lowry assay. Triton X-100 extracts (1.5 to 2.5 mg of protein) were incubated for 30 min at 4°C and centrifuged (13 000 g, 4°C, 10 min.) to separate the detergent-insoluble pellet. TX-100-insoluble pellet was resuspended in 0.5 mL of lysis buffer mixed with 2 M sucrose (1 mL), overlaid with 1 M (2 mL) and 0.2 M (1.5 mL) sucrose, and centrifuged for 18 h at 200 000 g (SW 60 Ti; Beckman) at 4°C. After centrifugation, 1 mL fractions were collected at 4°C from the top to the bottom of the gradient. Equal volumes of each fraction were subjected to sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and immunoblot for the indicated proteins.

Preparation of synaptosomal fractions, synaptic lipid rafts and post-synaptic densities

Synaptic lipid rafts and post-synaptic densities were isolated from synaptosomal fraction as described earlier (Besshoh *et al.* 2005) with some modifications. Synaptosomal fraction was prepared from the mixed insular cortices of three animals per sample. Insular cortices were rapidly removed and homogenized in 1 mL of ice-cold solution A (0.32 M sucrose, 0.5 mM CaCl_2 , 1 mM each of NaHCO_3 , MgCl_2 and NaF, 2 mM sodium orthovanadate, 20 mM of glycerol 2-phosphate, complete protease inhibitors cocktail, Roche). Twelve up and down strokes performed homogenization with a Teflon glass homogenizer. The sample was centrifuged at 1000 g for 5 min, the pellet was washed with 0.5 mL of solution A and centrifuged again at 1000 g for 5 min. The supernatants were mixed and centrifuged at 15 000 g for 15 min. The resulting pellet was suspended in solution B (solution A without CaCl_2 and MgCl_2), loaded on the top of a discontinuous sucrose gradient (equal volumes of 0.85, 1.0 and 1.2 M sucrose, each prepared in solution B) and centrifuged at 82 500 g for 2 h. The band sedimenting between 1.0 and 1.2 M sucrose (synaptosomes) was collected. Protein concentration was determined by Lowry assay. Equal protein concentration of synaptosomal fraction (400–600 µg) was diluted with solution C (solution B minus sucrose and NaHCO_3). Synaptosomes were pelleted by centrifugation at 40 000 g for 30 min and resuspended in 40% (w/v) sucrose in solution C and Triton X-100 was added to give a final detergent concentration of 0.5% (w/v) in 1.5 mL of sample. The suspension was incubated for 30 min at 4°C and was placed beneath a discontinuous sucrose gradient [2 mL of 30% (w/v) and 1.5 mL of 5% (w/v) sucrose prepared in solution C] and centrifuged at 200 000 g for 18 h. Following centrifugation, 1 mL samples were collected from the top of the gradient (0.5 mL samples were collected where it is indicated); and the pellet, termed post-synaptic densities, was resuspended in 1 mL of solution C. Equal volumes of each fraction were separated by SDS–PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies.

Immunoblot analysis

To analyze the total amount of proteins, both insular cortices of each rat (one rat per sample) were homogenized using sonication in ice-cold lysis buffer pH 7.5 containing 50 mM Tris-HCl,

150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% SDS, 10 mM Na₃VO₄, 25 mM sodium fluoride and complete protease inhibitors (Roche). Protein concentrations were determined by Lowry assay and 20 µg samples were mixed with Laemmli buffer to reach a final volume of 30 µL and then boiled for 3 min and subjected to vertical slab 7.5% SDS-PAGE. Electrophoresis was carried out at 110 V for 1.5 h. Proteins were electrophoretically transferred to Immobilon-P membrane (Bio-Rad) at 25 V for 50 min. The transfer buffer consisted of 2 mM Tris-HCl, 39 mM glycine, 0.1% SDS and 20% (vol/vol) methanol. The membrane was then incubated overnight at 4°C in Tris-buffered saline (TBS)-T (Tris 10 mM, NaCl 0.9%, Tween 20 0.1%, pH 7.5) containing 5% bovine serum albumin. For NMDAR subunits, polyvinylidene difluoride membranes were incubated for 24 h at 4°C with: goat polyclonal antibody anti NR2A and NR2B subunits (1 : 500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA, Catalog number sc-1467, sc-1468 and sc-1469, respectively), Sheep polyclonal anti PSD-95 (1 : 1000; Zymed, CA, USA, catalog number 51-6700), Mouse monoclonal anti Flotillin-1 (1 : 1000; BD Biosciences, Catalog number 610821). The membrane was washed (four times/5 min) in TBS-T, and incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody [Goat anti mouse IgG (Zimed) Catalog number 626620; donkey anti sheep IgG (Sigma, St Louis, MO, USA) Catalog number A3415; and donkey anti goat (Chemicon International)]. Membranes were washed (four times/10 min) in TBS-T, incubated with chemiluminescence's reagent (Immobilon™ Wester, Millipore, Billerica, USA) and exposed to X-ray film. Result films were scanned and levels of immunoreactivity were quantified densitometrically with the 1.31V ImageJ software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Negative controls were prepared by omission of primary antibodies.

Immunoprecipitation

The insular cortices of rats from trained and swimming control groups (one animal per sample) were extracted and homogenized in ice-cold lysis buffer pH 7.5 containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% SDS, 10 mM sodium orthovanadate, 25 mM sodium fluoride and protease inhibitors cocktail. All procedures were made at 4°C. Samples were centrifuged at 1500 g for 5 min. The supernatants were collected and protein concentrations determined by the Lowry assay. Equal amounts of protein (1000 µg) and 10 µL of polyclonal antibody were then used for NR2B immunoprecipitation overnight. Samples were incubated with protein G-Agarose beads (Roche) for 2 h at 4°C and the immune complexes were isolated by centrifugation at 1500 g during 2 min. The pellets were washed twice with lysis buffer and centrifuged at 1500 g during 2 min. The pellet was washed twice with buffer 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, (0.1% Nonidet P40, pH 7.5) and one more time with buffer 50 mM Tris-HCl pH 7.5. Samples were centrifuged at 12 000 g during 3 min and the pellets were re-suspended in 20 µL of laemmli buffer. The bound proteins were eluted by boiling during 5 min and centrifuged during three min at 2000 g. After centrifugation, 25 µL of the sample were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies. The membranes were incubated with NR2B phosphotyrosine 1472 monoclonal antibody (1 : 1000) (Cat. M2442, Sigma) during 24 h at 4°C. They were washed (four times/5 min) in TBS-T,

and incubated for 1 h with anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antibody (1 : 3000; Santa Cruz Biotechnology). After the membrane was revealed by chemiluminescence, it was incubated with stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM 2-mercapto-ethanol, 2% SDS) two times/20 min at 70°C and washed (five times/5 min) in TBS-T, then it was incubated with anti NR2B antibody (1 : 500; Santa Cruz Biotechnology). Densitometric analysis of phosphotyrosine 1472 was corrected in relation to NR2B content. No signal was detected when NR2B antibody was omitted during immunoprecipitation.

Dot-blot

To determine expression levels of the monosialoganglioside (GM1) in each fraction, 1 µL of each density gradient fraction were dot blotted on nitrocellulose, and blocked as described above. After incubation with horseradish peroxidase-conjugated cholera toxin B (Sigma), diluted 1 : 10 000 the dots were revealed by chemiluminescence.

Statistical analysis

Each data represents an independent group of animals. Independent experiments were replicated a minimum of four times; each replica involved mixed tissues of various animals ($n \geq 4$). The statistical analysis took into account the number of replicas, not the number of animals used. Statistical differences between trained and control group were evaluated using the unpaired Student's *t*-test. Comparison between multiple groups was by ANOVA with *post-hoc* analysis by Fisher's protected least significant difference test. All results are expressed as the mean \pm SEM.

Results

Recruitment of NMDAR to lipid rafts in insular cortex during spatial training

Rafts are typically isolated as a low-density and detergent-resistant fraction after density gradient centrifugation (Simons *et al.* 1998). To determine if spatial training induces changes in association of NMDARs with lipid rafts microdomains, we isolated whole cell lipid rafts from homogenized insular cortex, based on their insolubility in Triton X-100 at 4°C (Brown 2006) and their ability to float in density gradients as described previously (Marta *et al.* 2003). Samples of the fractions obtained from sucrose gradients were analyzed by Western blot to locate the presence of lipid rafts markers flotillin-1 and monosialoganglioside (GM1) (dot-blot assay using cholera-toxin subunit B). We also blotted PSD95, NR2A and NR2B subunits which have been reported to reside in the lipid raft fraction (Hering *et al.* 2003; Marta *et al.* 2003). GM1 was greatly enriched in sucrose gradients, whereas low levels were detected in the other fractions. Similar to sphingolipids, Flotillin-1 showed higher enrichment in fraction 2 (Fig. 1a). As previously reported, PSD-95, NR2B and NR2A subunits of NMDAR were also present in the light fractions. (Hering *et al.* 2003).

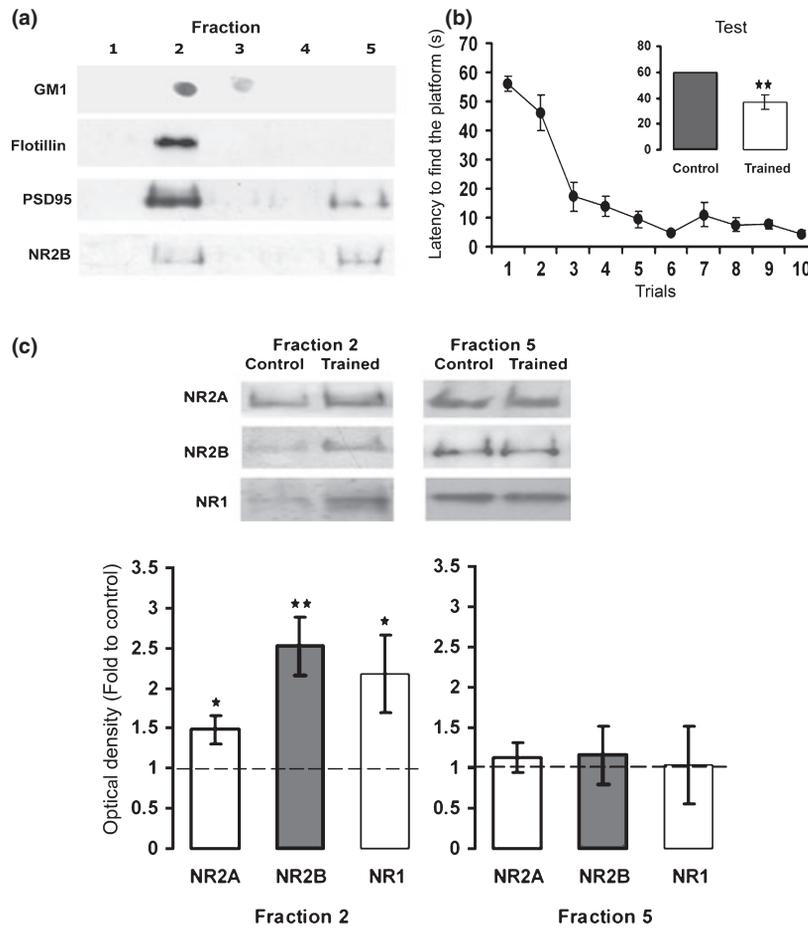


Fig. 1 (a) Isolation of lipid raft from insoluble extract. Both insular cortices of three rats per sample were extracted in 1% Triton X-100 and separated on a density gradient. Five fractions (from top to bottom of the gradient) were obtained and immunoblotted for the indicated proteins. The fractions were also assayed for the sphingolipid GM1 (dot-blot assay using cholera toxin), this experiment was repeated with the same results. (b) Graph shows the mean (\pm SEM) latency to find the platform of nine animals during the water maze training. Five swimming control rats swam (without a platform) the average time registered for the trained group. Inside graph shows the mean (\pm SEM) latency to find the platform during a test 24 h after training of

the nine trained animals (white bar) and the five swimming control rats (dark bar). (c) Effects of spatial training on the association of NR2A, NR2B and NR1 subunits with lipid raft fraction in insular cortex. Insular cortices of independent groups of trained and controls rats (two animals per sample in each experiment) were separated by a density gradient, fractions 2 (lipid rafts) and 5 (high density) were collected and analyzed by immunoblot for NR2A, NR2B, and NR1 subunit. Densitometric analysis from blots of five independent experiments is shown in bar graph. Results are expressed as the ratio of immunoreactivity (mean \pm SEM) of trained over control rats. $**p < 0.01$, $*p < 0.05$.

After standardizing lipid raft isolation, we compared the amount of NR1, NR2A and NR2B subunits in fraction 2 (lipid raft) and fraction 5 (heavy-density fractions), from trained and swimming control rats. Figure 1(b) shows the learning curve of rats trained during one session of ten trials in the water maze. Trained rats performed better 24 h after training as compared to the swimming control animals. Insular cortex of trained rats contained higher concentration of NR1, NR2B and NR2A subunits in the fraction 2 (lipid raft) than swimming control rats, while there were no changes in the fraction 5 (Fig. 1c). Fraction 5 is composed of another insoluble structure based on

protein-protein interactions, such as cytoskeleton, this fraction is enriched in the β -tubulin and β -actin (Marta *et al.* 2003).

Spatial training does not induce insertion of NMDAR to synaptic membrane

The insertion of NMDAR (synthesized de novo or coming from intracellular pools) to the synaptosomal membrane during other plasticity processes, such as long term potentiation (LTP) induction and ocular dominance plasticity induced by visual deprivation has been reported (Quinlan *et al.* 1999; Grosshans *et al.* 2001). To determine if the

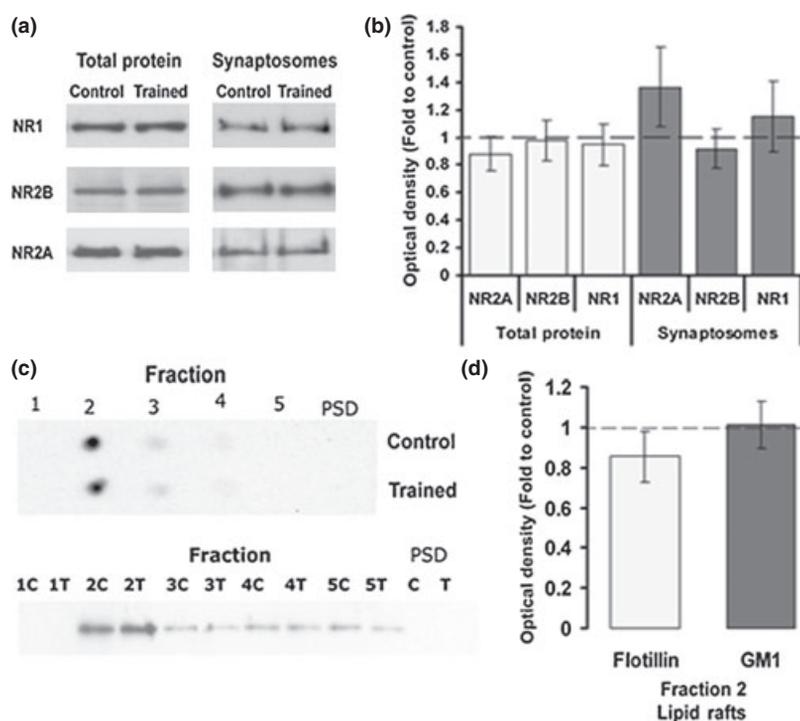


Fig. 2 Spatial training does not change NMDAR content in synaptosomal fraction nor concentration of synaptic lipid raft markers in insular cortex. (a) Representative NR2A, NR2B and NR1 immunoblot of 3 μ g synaptosomal protein (three rats per sample for each independent experiment) and 10 μ g total extract (one rat per sample). (b) Densitometric analysis from blots (a) expressed as the ratio of immunoreactivity in trained versus swimming control animals. Results are expressed as the mean \pm SEM for four independent experiments. No difference was observed between trained and swimming conditions.

(c) Sucrose gradients were analyzed by immunoblot for flotillin-1 and dot blot for GM1 to identify synaptic lipid rafts fraction and compare flotillin-1 and GM1 content in lipid rafts fraction between trained and control animals (three rats per sample for each experiment). Equal volumes of each gradient fraction were analyzed. (d) Densitometric analysis from fraction 2 of blots showed in (c) expressed as the ratio (trained versus swimming control animals) of immunoreactivity mean \pm SEM for four independent experiments.

increase of NMDAR subunits in lipid raft membrane indicates the insertion of receptors to the synaptic membrane or a lateral mobility to lipid raft membrane, we isolated synaptosomes of the insular cortex and evaluated NR1, NR2A, and NR2B subunit level in synaptosomes, as well as in the total extract of insular cortex. There were no significant changes in the amount of synaptosomal or total NMDARs subunits between trained and swimming control rats (Fig. 2a and b).

Redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities during training

We isolated synaptic lipid rafts and post-synaptic densities from the synaptosomal fraction of trained and control rats, incubated with 1% Triton X-100 on sucrose gradients. Five fractions from the top to the bottom of the gradient and the pellet (postsynaptic densities) were analyzed to locate the presence of flotillin-1 and GM1 and identify fractions enriched in lipid rafts. To assess training effects on the properties and recovery of lipid rafts, we analyzed fraction 2 of trained and

control rats. Based on the distribution of flotillin-1 and GM1, spatial training did not change the concentration of synaptic lipid rafts (fraction 2) (Fig. 2c and d).

Then we analyzed the distribution of NR1, NR2A and NR2B in the density gradient in trained and control rats. We found a significant increase of NR1, NR2A and NR2B subunits in synaptic lipid rafts (fraction 2) of the trained when compared with the control animals, whereas we found a significant decrease in post-synaptic densities (pellet) of the trained rats (Fig. 3). We also compared the amount of PSD-95 between trained and control rats in post-synaptic density, synaptic lipid rafts and synaptosomes. Like the NMDAR, PSD-95 was also increased in lipid raft fraction and decreased in post-synaptic density, whereas there were no changes in synaptosomes (Fig. 4a and b).

Postsynaptic density-95 and NMDA subunits were highly concentrated in the PSD fraction with respect to lipid raft fraction, the expositions of the radiographic film to analyze PSD fraction were very short as compared to the exposition to analyze lipid rafts fraction (1 and 20 min respectively).

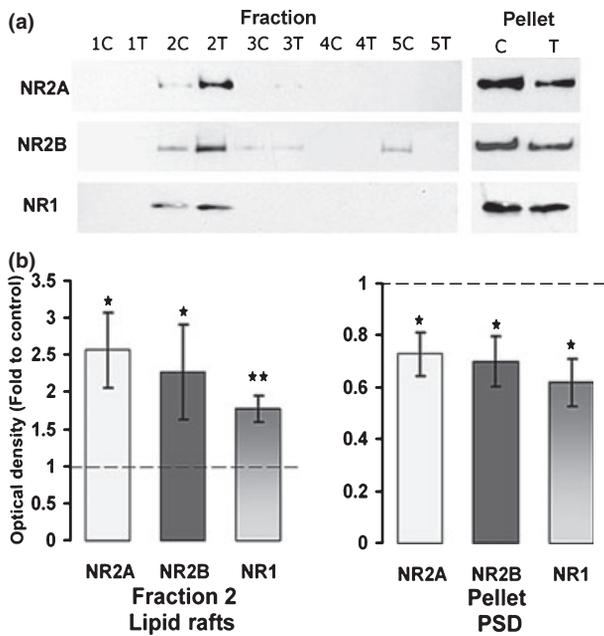


Fig. 3 Effects of spatial training on content of NMDAR in synaptic lipid rafts and PSD. Lipid rafts were prepared from synaptosomes from trained and control animals (three rats per sample for each experiment). (a) Representative immunoblot for NR2A, NR2 and NR1 of sucrose gradient fractions. Equal volumes of each fraction were analyzed. (b) Densitometric analysis from fraction 2 and pellet of blots showed in (a). Results are expressed as ratio of immunoreactivity (mean ± SEM) in trained versus control rats for five independent experiments. ***p* < 0.01, **p* < 0.05.

However, to assess the relative distribution of these proteins between synaptic lipid rafts and PSD fractions, we exposed the membranes during 5 min to the film. The proportion of PSD-95 in lipid rafts fraction was $7 \pm 2\%$ in control and $26 \pm 3\%$ in trained rats ($p < 0.0005$, $n = 4$). The proportion of NR1 subunits was $19 \pm 7\%$ in control rats and $45 \pm 7\%$ in trained rats ($p < 0.05$, $n = 4$); NR2A was $8 \pm 5\%$ in control and $16 \pm 7\%$ in trained rats; NR2B was $5 \pm 0.1\%$ in control and $16 \pm 4\%$ in trained rats ($n = 3$). Removal of cholesterol by treatment of membranes with methyl- β -cyclodextrin is widely used to indicate the association of proteins with lipid rafts. Treatment of synaptosomes with methyl- β -cyclodextrin prior extraction with Triton X-100 avoids NMDAR and PSD-95 from the low-density region of the gradient, that it is consistent with their association with lipid rafts (Fig. 4c).

Tyr-1472 NMDAR phosphorylation

In addition, since the Tyr-1472 phosphorylation of the NR2B subunit has been associated to plastic changes (Nakazawa *et al.* 2002), we studied whether the translocation of the NMDAR to lipid rafts drew a parallel with an increased in Tyr-1472 phosphorylation. Therefore, we performed NR2B subunit immunoprecipitation and western blot to detect Tyr-1472 phosphorylation from crude insular cortex

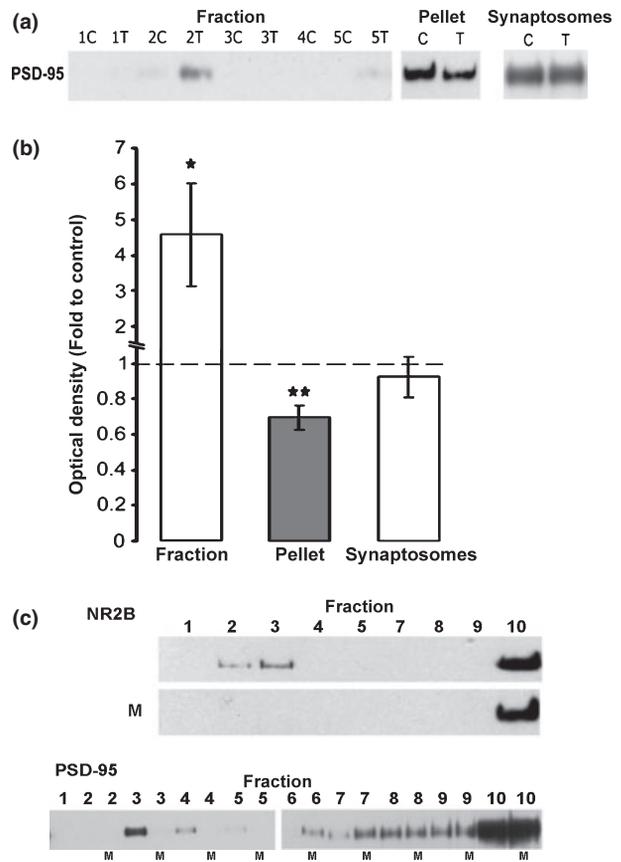


Fig. 4 Effect of spatial training on PSD-95 content in synaptic lipid rafts and PSD. Lipid rafts were prepared from synaptosomes from trained and control animals (three rats per sample for each experiment). (a) Representative immunoblot for PSD-95 of sucrose gradient fractions. Equal volumes of each fraction and $3 \mu\text{g}$ of synaptosomal protein was analyzed. (b) Densitometric analysis from fraction 2, pellet and synaptosomes. Results are expressed as ratio of immunoreactivity (mean ± SEM) in trained versus control rats for five independent experiments. ***p* < 0.01, **p* < 0.05. (c) Synaptosomes were extracted from brain cortex in 0.5% Triton X-100 and separated on a sucrose gradient. Synaptosomes were incubated 30 min with (M) or without 50 mM methyl- β -cyclodextrin (MBC) prior extraction with Triton X-100, centrifugation, fraction separation (10 fractions was obtained) and analysis of by SDS-PAGE and immunoblotting for PSD-95 and NR2B.

homogenates of trained and swimming control rats. The results showed that trained rats presented a larger amount of phosphorylated Tyr-1472 compared to control rats (Fig. 5). Additionally, we analyzed the NR2B phosphorylation at Tyr-1472 in the hippocampus and did not detect any changes between trained and swimming control rats.

Increase of NR1 and NR2A but not NR2B in hippocampal lipid rafts

To analyze if translocation of NMDARs to lipid rafts during spatial training occurs in the hippocampus, we isolated the whole cell lipid rafts from the dorsal hippocampus

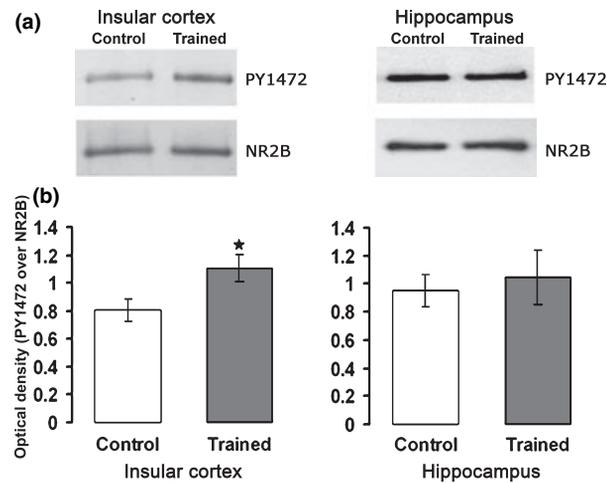


Fig. 5 Effect of water maze training on NR2B Tyr-1472 phosphorylation. (a) NR2B immunoprecipitated from insular cortex and hippocampus of trained and control rats (one rat per sample) were immunoblotted for Tyr-1472 and NR2B. (b) Immunoblots were scanned and results were expressed as the ratio of Tyr-1472 phosphorylation immunoreactivity over total NR2B. Results are the mean \pm SEM from nine (insular cortex) and 12 (hippocampus) separate animals on each condition. * $p < 0.05$.

homogenate and compared the amount of NR1, NR2A and NR2B subunits in fraction 2 (lipid raft) and fraction 5 (high-density fractions), from trained and swimming control rats. Hippocampus of trained rats contained higher concentration of NR1, and NR2A subunits in the lipid raft fraction than swimming control rats, while no change in fraction 5 was detected (Fig. 6a). Surprisingly, we did not detect any change in NR2B concentration in the lipid rafts fraction.

In order to provide additional information as to how specific is the recruitment of NMDAR to lipid rafts during spatial memory formation, we isolated lipid rafts from parietal cortex. There is scarce information about the participation of NMDAR in this region during spatial learning. We did not find differences in the amount of NMDAR subunits in fraction 2 between trained and control rats (Fig. 6b).

Discussion

There is abundant evidence showing that lipid rafts are involved in the activation and modulation of cell signaling pathways (Hering *et al.* 2003; Guirland *et al.* 2004). Besshoh and collaborators showed a reduction of NR1, NR2A and NR2B in lipid rafts following ischemia and Albulrob and collaborators showed a neuroprotective effect against NMDA-induced excitotoxicity by means of the disruption of lipid rafts (Abulrob *et al.* 2005; Besshoh *et al.* 2005). These findings are consistent with a model involving more efficient signal of NMDAR when incorporated to lipid rafts;

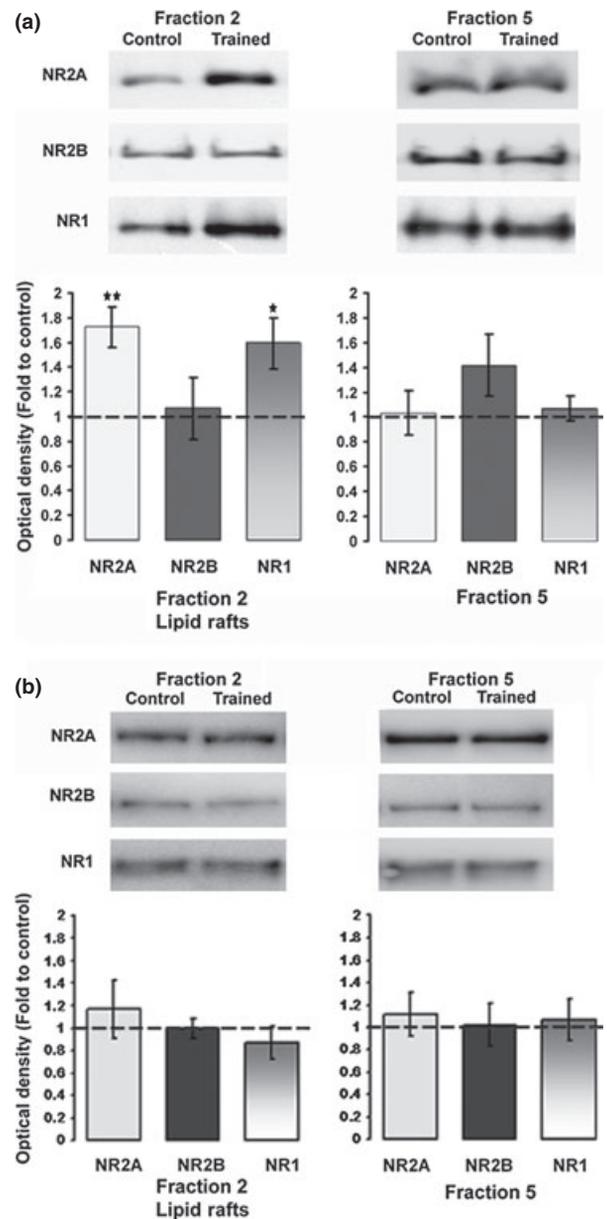


Fig. 6 Effect of spatial training on the association NR2A, NR2B, NR1 subunits lipid raft in hippocampus and parietal cortex. (a) Lipid rafts were isolated from insoluble extracts of hippocampus of trained and control rats sacrificed immediately after one session of water maze training (two animals per sample for each experiment). Fractions 2 and 5 analyzed by immunoblot against NR2A, NR2B and NR1 subunits. Densitometry analysis from blots of five independent experiments is shown in bar graph. (b) Lipid rafts were isolated from insoluble extracts of parietal cortex of trained and control rats sacrificed immediately after one session of water maze training (one animal per sample for each experiment). Fractions 2 (lipid rafts) and 5 (high density) analyzed by immunoblot against NR2A, NR2B and NR1 subunits. Densitometric analysis from blots of 8 independent experiments is shown in bar graph. Results are expressed as the ratio of immunoreactivity (mean \pm SEM) of trained versus control rats ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

therefore, we investigated the possibility that NMDAR translocation to synaptic lipid rafts plays a role in synaptic plasticity processes such as memory formation.

Our results show that in the IC, training in the water maze induces translocation of NR1, NR2A and NR2B subunits to lipid rafts. This training does not change subunit expression, nor affects overall lipid raft recovery, as reflected by synaptic lipid raft content of GM1 and flotillin-1. The insertion of NMDARs to the synaptic membrane during plasticity processes has been reported (Quinlan *et al.* 1999; Grosshans and Browning 2001). Grosshans and collaborators showed a substantial pool of intracellular NMDAR available for recruitment to the synaptic membrane, this intracellular pool was isolated outside synaptosomes. Thirty minutes after LTP stimulation, they observed a significant decrease of NR2A, NR1 and NR2B in the intracellular pools and increase in the synaptosomal membranes (Grosshans and Browning 2001). In our model (only one day of training), we did not find any increase of NMDAR in synaptosomal fraction, therefore there was no increase in the NMDAR insertion to synaptic membrane, nevertheless we observed an increase of NMDARs in the lipid rafts and decrease in PSD fractions obtained from this synaptosomal fraction. Although the origin of the additional raft-associated receptors is not clear, our findings suggest that NMDARs move laterally from post-synaptic density regions not associated with lipid rafts to lipid rafts microdomains. We used the method described by Besshoh with some modifications to isolate synaptosomal fractions, synaptic lipid rafts and post-synaptic densities. As Besshoh *et al.* (2005) reported, the lipid raft fraction prepared from synaptosomes is heterogeneous, potentially containing rafts derived from the synaptic region itself, as well as rafts from perisynaptic and extrasynaptic membranes and from the pre-synaptic nerve terminal.

We show that the localization of NMDAR and PSD-95 in low density fraction is abolished by methyl- β -cyclodextrin (MBC) treatment. However, Besshoh found a high proportion of PSD-95 and NMDAR ($\approx 60\%$) associated with the rafts, while we detect a smaller proportion of PSD-95 in lipid raft fractions. Previous studies have reported the presence of as little as $\approx 10\%$ of PSD-95 in lipid rafts (Suzuki *et al.* 2001; Hering *et al.* 2003; Ma *et al.* 2003; Besshoh *et al.* 2005). The reasons for this variation are not known but may in part be related to different conditions of detergent extraction, it has been reported that protein to detergent ratio is important for the extraction of the lipid raft proteins, large solubilization may disrupt weak interactions of proteins with raft domains (Lingwood and Simons 2007). Besshoh and coworkers used a protein to detergent ratio of 1 : 1. Since the protein amount is less than 1 mg from the tissue obtained of each IC, the ratio that we used was ≈ 0.06 : 1. Therefore, extraction conditions that we used for the preparation of synaptic lipid rafts were more stringent, and NMDAR and

PSD-95 proteins that we obtained in lipid rafts fraction must have had a strong interaction with lipid rafts membrane.

NMDA receptor is not acylated, and therefore, a different mechanism must exist to bring them into these membrane subdomains. As it happens with the NMDAR, we found that water maze training increases the association of PSD-95 with lipid rafts, whereas it decreases in post-synaptic densities, without any change in synaptosomal fraction. PSD-95 is an adaptor protein that plays important roles in NMDAR synaptic targeting and signaling. This protein contains two palmitoylated cysteines within the N-terminal region, that allows its association with lipid rafts (Melkonian *et al.* 1999; Zacharias *et al.* 2002). Our results suggest that the translocation of PSD-95 to lipid rafts during spatial training brings NMDAR into these membrane subdomains. A study reported that mutant PSD-95 protein impaired water maze learning in mice (Migaud *et al.* 1998). Moreover, several studies have shown that the C-terminal T/SXV motifs of NR2A and NR2B can directly interact with the PSD-95/Dlg/ZO-1 (PDZ) domains of PSD-95. NMDAR-PSD-95 interaction induces the post-synaptic clustering of NMDARs. (Kornau *et al.* 1995; Kim *et al.* 1996; Chung *et al.* 2004), and palmitoylation of PSD-95 is essential and specific to this clustering (Melkonian *et al.* 1999; Zacharias *et al.* 2002). The palmitoylation of PSD-95 cannot be replaced by alternative membrane association motifs, suggesting that its interactions with lipid rafts are involved in NMDAR-PSD-95 clustering. The participation of lipid rafts in acetylcholine receptors clustering has been reported (Campagna and Fallon 2006; Stetzkowski-Marden *et al.* 2006). Clustering of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) requires association with rapsyn, a myristoylated membrane protein at the motor endplate (Gautam *et al.* 1995; Marchand *et al.* 2000). Disruption of lipid rafts inhibits nAChR clustering. Rapsyn, is located constitutively in lipid rafts and recruits the nAChR to lipid rafts in response to agrin (Zhu *et al.* 2006).

In the brain, mechanisms involved in receptor clustering and translocation into lipid rafts are less certain. However, in glutamatergic synapses the post-synaptic density protein PSD-95 could exert an equivalent function to the one displayed by rapsyn at the neuromuscular junction. PSD-95 could recruit NMDAR and other proteins to lipid rafts. This adaptor protein induces clustering and recruitment into lipid rafts of other proteins that are not acylated. Co-expression of PSD-95 increased the amount of Kv1.4 (voltage-gated potassium channels) and ErbB4 (Neuregulin receptor). Furthermore, deletion of the PSD-95 binding motif of Kv1.4 eliminated this recruitment, as did substituting a palmitoylation-deficient PSD-95 mutant (Ma *et al.* 2003). We do not know whether other proteins associate or not associated to PSD-95 are recruited to lipid rafts during training. However, in this paper we demonstrate that another protein present in lipid rafts (flotillin-1) did not change. Additional experiments in our laboratory show no change in

the amount of protein kinase C associated to lipid rafts in insular cortex after identical training protocol (unpublished observation). We also showed that NR2B subunits were recruited to lipid rafts in insular cortex but were not recruited in hippocampus. Taken together these data show the specificity of the proteins recruitment to lipid rafts during the training in different structures. Additionally, we showed that in parietal cortex, the spatial training did not induce changes in any subunit of the NMDAR.

Furthermore, we found that spatial training induced tyrosine 1472 NR2B subunit phosphorylation. NR2B tyrosine phosphorylation is at least partially mediated by a signaling cascade involving the sequential activation of protein kinase C, proline-rich tyrosine kinase 2 and Src family kinases (Chung *et al.* 2004). Nakazawa and collaborators identified Tyr-1472 of the NR2B subunit as the main phosphorylation site *in vitro* and have shown that this tyrosine is phosphorylated by fyn, a member of the Src family kinases. The level of Tyr-1472 phosphorylation is increased following the induction of LTP in the hippocampus, suggesting that fyn-mediated phosphorylation of Tyr-1472 is involved in synaptic plasticity (Nakazawa *et al.* 2002). However, Tyr-1472 phosphorylation may not regulate NMDAR channel properties but rather regulate NMDAR localization or downstream signaling pathways (Kohr and Seeburg 1996). Recently, Nakazawa showed that Y1472F mutant of the NR2B subunit shows improper localization at synapses in the amygdala (Nakazawa *et al.* 2006). Besshoh and collaborators reported that following ischemia the phosphorylation of NR2B (pY1472) was increased in both synaptic lipid rafts and PSDs. The increase was greater in synaptic lipid rafts than in PSDs. The NR2B Y1472 phosphorylation could be the trigger for NMDAR subunits translocation to the lipid rafts or it could be a consequence of the receptor undergoing a higher interaction with the kinases that phosphorylate it inside of the lipid rafts.

We also studied whether the translocation of NMDAR to lipid rafts occurs in the hippocampus because water maze learning has been extensively studied in this structure. We showed that NR2A and NR1 increased in the lipid rafts fraction; however, we did not find any increase of NR2B in the lipid rafts fraction. This result suggests that in the hippocampus, spatial training induces translocation only for the NR2A/NR1. Specifically, a differential participation of NR2A and NR2B subunits among different brain regions during synaptic plasticity induction has been reported. Liu and collaborators showed that selectively blocking NR2B in hippocampus abolishes the induction of long-term depression (LTD) but not LTP, whereas inhibition of NR2A prevents the induction of LTP without affecting LTD induction (Liu *et al.* 2004). However, another study reported that antisense oligonucleotides treatment to knock down NR2B subunit expression in the hippocampus of rats, abolished NMDA-dependent LTP, and impaired spatial learning (Clayton *et al.* 2002). Additionally it

was reported that the participation of both NR2A and NR2B subunits is essential for the induction of LTP in two-week old rat hippocampus (Bartlett *et al.* 2007) and in P28 mice hippocampus (Berberich *et al.* 2005). Similar to our results, it has been demonstrated that prefrontal cortex activation of both NR2B and NR2A was critical for the induction of LTP and contextual Fear Memory (Zhao *et al.* 2005). This variety of results suggests that the participation of NR2B subunit during synaptic plasticity varies with the model and stimulation protocol. With the training protocol used in this work (only 10 training trials in one day), only the recruitment of NR1/NR2A receptors to lipid rafts occurs in the hippocampus, whereas in the insular cortex recruitment of both NR2A and NR2B occurs during spatial training. These changes could be due to that NR2B activation allows a greater intracellular increase of calcium, since NR2A subunit has faster kinetics and smaller conductance than NR2B (Monyer *et al.*, 1994; Sheng *et al.*, 1994; Ritter *et al.*, 2002, Cull-Candy *et al.* 2001). NR2B receptor phosphorylation has been reported in the hippocampus after 4 days of water maze training (four trials per day) (Mizuno *et al.* 2003). After one day of training, we did not detect any change in NR2B phosphorylation in the hippocampus. Taken together these results suggest differential temporal regulation of NR2A and NR2B subunits in different structures.

The control group used for this study consisted of animals that swam for the same period of time as the trained animals, but in the absence of a platform as previously reported (Ramirez-Amaya *et al.* 1999, 2001; Aguilar-Valles *et al.* 2005, 2007). A strong stress response occurred at first day of training but this response is similar in both groups, trained and swimming control rats (Aguilar-Valles *et al.* 2005). Therefore stress, physical exercise, water odor or taste did not cause the redistribution of NMDAR and PSD-95.

In summary, our results suggest that spatial training results in an increase of NMDAR in lipid rafts and in the subunit NR2B Y1472 phosphorylation in the insular cortex. This translocation occurs in synaptic regions and these receptors probably move from the post-synaptic densities not associated with lipid rafts, since this movement correlates with a decrease in this fraction. In the hippocampus spatial training induces translocation only of NR2A and NR1 subunits while translocation of NR2B was not observed. The translocation of NMDAR subunits to lipid rafts could be a mechanism of synaptic plasticity; however, additional experimentation is required to elucidate the relationship between this mobility and the plasticity processes induced by spatial training.

Acknowledgements

We thank for helpful comments on the manuscript to Dr. Ana Maria López-Colomé and Jan Pascal Morin. We also thank Oreste Carbajal for technical assistance. This study was supported by CONACYT-México 060478 and DGAPA-UNAM IN-220706-3.

References

- Abulrob A., Tauskela J. S., Mealing G., Brunette E., Faid K. and Stanimirovic D. (2005) Protection by cholesterol-extracting cyclodextrins: a role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution. *J. Neurochem.* **92**, 1477–1486.
- Aguilar-Valles A., Sanchez E., de Gortari P., Balderas I., Ramirez-Amaya V., Bermudez-Rattoni F. and Joseph-Bravo P. (2005) Analysis of the stress response in rats trained in the water-maze: differential expression of corticotropin-releasing hormone, CRH-R1, glucocorticoid receptors and brain-derived neurotrophic factor in limbic regions. *Neuroendocrinology* **82**, 306–319.
- Aguilar-Valles A., Sanchez E., de Gortari P., Garcia-Vazquez A. I., Ramirez-Amaya V., Bermudez-Rattoni F. and Joseph-Bravo P. (2007) The expression of TRH, its receptors and degrading enzyme is differentially modulated in the rat limbic system during training in the Morris water maze. *Neurochem. Int.* **50**, 404–417.
- Bartlett T. E., Bannister N. J., Collett V. J., Dargan S. L., Massey P. V., Bortolotto Z. A., Fitzjohn S. M., Bashir Z. I., Collingridge G. L. and Lodge D. (2007) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus. *Neuropharmacology LTP: Forty Unforgettable Years. A Festschrift in Honour of Professor Tim Bliss FRS* **52**, 60–70.
- Becher A., White J. H. and McIlhinney R. A. (2001) The gamma-aminobutyric acid receptor B, but not the metabotropic glutamate receptor type-1, associates with lipid rafts in the rat cerebellum. *J. Neurochem.* **79**, 787–795.
- Berberich S., Punnakal P., Jensen V., Pawlak V., Seeburg P. H., Hvalby O. and Kohr G. (2005) Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* **25**, 6907–6910.
- Besshoh S., Bawa D., Teves L., Wallace M. C. and Gurd J. W. (2005) Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. *J. Neurochem.* **93**, 186–194.
- Bohbot V. D., Iaria G. and Petrides M. (2004) Hippocampal function and spatial memory: evidence from functional neuroimaging in healthy participants and performance of patients with medial temporal lobe resections. *Neuropsychology* **18**, 418–425.
- Brown D. A. (2006) Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)* **21**, 430–439.
- Campagna J. A. and Fallon J. (2006) Lipid rafts are involved in C95 (4,8) agrin fragment-induced acetylcholine receptor clustering. *Neuroscience* **138**, 123–132.
- Chung H. J., Huang Y. H., Lau L. F. and Haganir R. L. (2004) Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J. Neurosci.* **24**, 10248–10259.
- Clayton D. A., Mesches M. H., Alvarez E., Bickford P. C. and Browning M. D. (2002) A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *J. Neurosci.* **22**, 3628–3637.
- Cull-Candy S., Brickley S. and Farrant M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 327–335.
- Davis S., Butcher S. and Morris R. (1992) The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J. Neurosci.* **12**, 21–34.
- Eichenbaum H., Stewart C. and Morris R. (1990) Hippocampal representation in place learning. *J. Neurosci.* **10**, 3531–3542.
- Fong D. K., Rao A., Crump F. T. and Craig A. M. (2002) Rapid synaptic remodeling by protein kinase C: reciprocal translocation of NMDA receptors and calcium/calmodulin-dependent kinase II. *J. Neurosci.* **22**, 2153–2164.
- Gautam M., Noakes P. G., Mudd J., Nichol M., Chu G. C., Sanes J. R. and Merlie J. P. (1995) Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* **377**, 232–236.
- Groc L., Heine M., Cognet L., Brickley K., Stephenson F. A., Lounis B. and Choquet D. (2004) Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat. Neurosci.* **7**, 695–696.
- Grosshans D. R. and Browning M. D. (2001) Protein kinase C activation induces tyrosine phosphorylation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor. *J. Neurochem.* **76**, 737–744.
- Guirland C., Suzuki S., Kojima M., Lu B. and Zheng J. Q. (2004) Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron* **42**, 51–62.
- Gutierrez H., Hernandez-Echeagaray E., Ramirez-Amaya V. and Bermudez-Rattoni F. (1999) Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience* **89**, 751–758.
- Harris E. W., Ganong A. H. and Cotman C. W. (1984) Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res.* **323**, 132–137.
- Hering H., Lin C. C. and Sheng M. (2003) Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J. Neurosci.* **23**, 3262–3271.
- Heynen A. J., Quinlan E. M., Bae D. C. and Bear M. F. (2000) Bidirectional, activity-dependent regulation of glutamate receptors in the adult hippocampus in vivo. *Neuron* **28**, 527–536.
- Kim E., Cho K. O., Rothschild A. and Sheng M. (1996) Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron* **17**, 103–113.
- King J. A., Burgess N., Hartley T., Vargha-Khadem F. and O'Keefe J. (2002) Human hippocampus and viewpoint dependence in spatial memory. *Hippocampus* **12**, 811–820.
- Kohr G. and Seeburg P. H. (1996) Subtype-specific regulation of recombinant NMDA receptor-channels by protein tyrosine kinases of the src family. *J. Physiol.* **492**, 445–452.
- Kornau H. C., Schenker L. T., Kennedy M. B. and Seeburg P. H. (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* **269**, 1737–1740.
- Lingwood D. and Simons K. (2007) Detergent resistance as a tool in membrane research. *Nat. Protoc.* **2**, 2159–2165.
- Liu L., Wong T. P., Pozza M. F., Lingenhoehl K., Wang Y., Sheng M., Auberson Y. P. and Wang Y. T. (2004) Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* **304**, 1021–1024.
- Ma L., Huang Y. Z., Pitcher G. M. *et al.* (2003) Ligand-dependent recruitment of the ErbB4 signaling complex into neuronal lipid rafts. *J. Neurosci.* **23**, 3164–3175.
- Malinow R. and Malenka R. C. (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* **25**, 103–126.
- Marchand S., Bignami F., Stetzkowski-Marden F. and Cartaud J. (2000) The myristoylated protein rapsyn is cotargeted with the nicotinic acetylcholine receptor to the postsynaptic membrane via the exocytic pathway. *J. Neurosci.* **20**, 521–528.
- Marta C. B., Taylor C. M., Coetzee T., Kim T., Winkler S., Bansal R. and Pfeiffer S. E. (2003) Antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein leads to its rapid repartitioning into detergent-insoluble fractions, and altered protein phosphorylation and cell morphology. *J. Neurosci.* **23**, 5461–5471.
- Melkonian K. A., Ostermeyer A. G., Chen J. Z., Roth M. G. and Brown D. A. (1999) Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins

- are acylated, while few are prenylated. *J. Biol. Chem.* **274**, 3910–3917.
- Migaud M., Charlesworth P., Dempster M. *et al.* (1998) Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* **396**, 433–439.
- Mizuno M., Yamada K., He J., Nakajima A. and Nabeshima T. (2003) Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation. *Learn. Mem.* **10**, 108–115.
- Monyer H., Burnashev N., Lauric D. J., Sakmann B. and Seeburg P. H. (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **12**, 529–540.
- Morris R. (1989) Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J. Neurosci.* **9**, 3040–3057.
- Morris R. G. M., Anderson E., Lynch G. S. and Baudry M. (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* **319**, 774–776.
- Mukherjee A., Arnaud L. and Cooper J. A. (2003) Lipid-dependent recruitment of neuronal Src to lipid rafts in the brain. *J. Biol. Chem.* **278**, 40806–40814.
- Nakazawa K., Quirk M. C., Chitwood R. A. *et al.* (2002) Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* **297**, 211–218.
- Nakazawa T., Komai S., Watabe A. M. *et al.* (2006) NR2B tyrosine phosphorylation modulates fear learning as well as amygdaloid synaptic plasticity. *EMBO J.* **25**, 2867–2877.
- Philpot B. D., Cho K. K. A. and Bear M. F. (2007) Obligatory role of NR2A for metaplasticity in visual cortex. *Neuron* **53**, 495–502.
- Quinlan E. M., Philpot B. D., Huganir R. L. and Bear M. F. (1999) Rapid, experience-dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex in vivo. *Nat. Neurosci.* **2**, 352–357.
- Radeva G. and Sharom F. J. (2004) Isolation and characterization of lipid rafts with different properties from RBL-2H3 (rat basophilic leukaemia) cells. *Biochem. J.* **380**, 219–230.
- Ramirez-Amaya V., Escobar M. L., Chao V. and Bermudez-Rattoni F. (1999) Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus* **9**, 631–636.
- Ramirez-Amaya V., Balderas I., Sandoval J., Escobar M. L. and Bermudez-Rattoni F. (2001) Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J. Neurosci.* **21**, 7340–7348.
- Ritter L. M., Vazquez D. M. and McAdor-Woodruff J. II (2002) Ontogeny of ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **139**, 227–236.
- Shallice T., Fletcher P., Frith C. D., Grasby P., Frackowiak R. S. J. and Dolan R. J. (1994) Brain regions associated with acquisition and retrieval of verbal episodic memory. *Nature* **368**, 633–635.
- Sheng M., Cummings J., Roldan L. A., Jan Y. N. and Jan L. Y. (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* **368**, 144–147.
- Simons M., Keller P., De Strooper B., Beyreuther K., Dotti C. G. and Simons K. (1998) Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons 10.1073/pnas.95.11.6460. *PNAS* **95**, 6460–6464.
- Stetzowski-Marden F., Recouvreur M., Camus G., Cartaud A., Marchand S. and Cartaud J. (2006) Rafts are required for acetylcholine receptor clustering. *J. Mol. Neurosci.* **30**, 37–38.
- Suzuki T., Ito J., Takagi H., Saitoh F., Nawa H. and Shimizu H. (2001) Biochemical evidence for localization of AMPA-type glutamate receptor subunits in the dendritic raft. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **89**, 20–28.
- Tovar K. R. and Westbrook G. L. (2002) Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* **34**, 255–264.
- Townsend M., Yoshii A., Mishina M. and Constantine-Paton M. (2003) Developmental loss of miniature N-methyl-D-aspartate receptor currents in NR2A knockout mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 1340–1345.
- Zacharias D. A., Violin J. D., Newton A. C. and Tsien R. Y. (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**, 913–916.
- Zhao M.-G., Toyoda H., Lee Y.-S. *et al.* (2005) Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron* **47**, 859–872.
- Zhu D., Xiong W. C. and Mei L. (2006) Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J. Neurosci.* **26**, 4841–4851.

Bibliografía

1. Cull-Candy, S., Brickley, S. & Farrant, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 327-35 (2001).
2. van Zundert, B., Yoshii, A. & Constantine-Paton, M. Receptor compartmentalization and trafficking at glutamate synapses: a developmental proposal. *Trends Neurosci* **27**, 428-37 (2004).
3. Wenthold, R.J., Sans, N., Standley, S., Prybylowski, K. & Petralia, R.S. Early events in the trafficking of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *Biochem Soc Trans* **31**, 885-8 (2003).
4. Wenthold, R.J., Prybylowski, K., Standley, S., Sans, N. & Petralia, R.S. Trafficking of NMDA receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**, 335-58 (2003).
5. Zukin, R.S. & Bennett, M.V. Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci* **18**, 306-13 (1995).
6. Traynelis, S.F., Burgess, M.F., Zheng, F., Lyuboslavsky, P. & Powers, J.L. Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit. *J Neurosci* **18**, 6163-75 (1998).
7. Traynelis, S.F., Hartley, M. & Heinemann, S.F. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* **268**, 873-6 (1995).
8. Ishii, T. et al. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem* **268**, 2836-43 (1993).
9. Cull-Candy, S.G. & Leszkiewicz, D.N. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* **2004**, re16 (2004).
10. Kornau, H.C. & Seeburg, P.H. Partner selection by PDZ domains. *Nat Biotechnol* **15**, 319 (1997).
11. Kornau, H.C., Seeburg, P.H. & Kennedy, M.B. Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Curr Opin Neurobiol* **7**, 368-73 (1997).
12. Scannevin, R.H. & Huganir, R.L. Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci* **1**, 133-41 (2000).
13. Grosshans, D.R. & Browning, M.D. Protein kinase C activation induces tyrosine phosphorylation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor. *J Neurochem* **76**, 737-44 (2001).
14. Li, B.S. et al. Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12742-7 (2001).
15. Liao, G.Y., Wagner, D.A., Hsu, M.H. & Leonard, J.P. Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-D-aspartate receptor current. *Mol Pharmacol* **59**, 960-4 (2001).
16. Lu, W.Y. et al. G-protein-coupled receptors act via protein kinase C and Src to regulate NMDA receptors. *Nat Neurosci* **2**, 331-8 (1999).
17. Salter, D.M., Wright, M.O. & Millward-Sadler, S.J. NMDA receptor expression and roles in human articular chondrocyte mechanotransduction. *Biorheology* **41**, 273-81 (2004).
18. Moon, I.S., Apperson, M.L. & Kennedy, M.B. The major tyrosine-phosphorylated protein in the postsynaptic density fraction is N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3954-8 (1994).
19. Nakazawa, K. et al. Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* **297**, 211-8 (2002).
20. Nakazawa, T. et al. NR2B tyrosine phosphorylation modulates fear learning as well as amygdaloid synaptic plasticity. *Embo J* **25**, 2867-77 (2006).

21. Wu, H.Y. et al. Fyn-mediated phosphorylation of NR2B Tyr-1336 controls calpain-mediated NR2B cleavage in neurons and heterologous systems. *J Biol Chem* **282**, 20075-87 (2007).
22. Gautam, M. et al. Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* **377**, 232-6 (1995).
23. Pittenger, C. & Kandel, E.R. In search of general mechanisms for long-lasting plasticity: Aplysia and the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 757-63 (2003).
24. Shu, S.Y., Wu, Y.M., Bao, X.M. & Leonard, B. Interactions among memory-related centers in the brain. *J Neurosci Res* **71**, 609-16 (2003).
25. Squire, L.R. The organization and neural substrates of human memory. *Int J Neurol* **21-22**, 218-22 (1987).
26. Squire, L.R. & McKee, R.D. Declarative and nondeclarative memory in opposition: when prior events influence amnesic patients more than normal subjects. *Mem Cognit* **21**, 424-30 (1993).
27. Squire, L.R. & Zola, S.M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13515-22 (1996).
28. Goelet, P., Castellucci, V.F., Schacher, S. & Kandel, E.R. The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* **322**, 419-22 (1986).
29. Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D.H. & Hirokawa, N. Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* **288**, 1796-802 (2000).
30. Choquet, D. & Triller, A. The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat Rev Neurosci* **4**, 251-65 (2003).
31. Tovar, K.R. & Westbrook, G.L. Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* **34**, 255-64 (2002).
32. Hynd, M.R., Scott, H.L. & Dodd, P.R. Glutamate(NMDA) receptor NR1 subunit mRNA expression in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **78**, 175-82 (2001).
33. Scott, D.B., Blanpied, T.A., Swanson, G.T., Zhang, C. & Ehlers, M.D. An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J Neurosci* **21**, 3063-72 (2001).
34. Standley, S., Roche, K.W., McCallum, J., Sans, N. & Wenthold, R.J. PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* **28**, 887-98 (2000).
35. McIlhinney, R.A. et al. Assembly intracellular targeting and cell surface expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1a and NR2A in transfected cells. *Neuropharmacology* **37**, 1355-67 (1998).
36. Quinlan, E.M., Philpot, B.D., Haganir, R.L. & Bear, M.F. Rapid, experience-dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex in vivo. *Nat Neurosci* **2**, 352-7 (1999).
37. Chung, H.J., Huang, Y.H., Lau, L.F. & Haganir, R.L. Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J Neurosci* **24**, 10248-59 (2004).
38. Kim, E., Cho, K.O., Rothschild, A. & Sheng, M. Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron* **17**, 103-13 (1996).
39. Grosshans, D.R., Clayton, D.A., Coultrap, S.J. & Browning, M.D. LTP leads to rapid surface expression of NMDA but not AMPA receptors in adult rat CA1. *Nat Neurosci* **5**, 27-33 (2002).

40. Heynen, A.J., Quinlan, E.M., Bae, D.C. & Bear, M.F. Bidirectional, activity-dependent regulation of glutamate receptors in the adult hippocampus in vivo. *Neuron* **28**, 527-36 (2000).
41. Rao, A. & Craig, A.M. Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuron* **19**, 801-12 (1997).
42. Crump, F.T., Dillman, K.S. & Craig, A.M. cAMP-dependent protein kinase mediates activity-regulated synaptic targeting of NMDA receptors. *J Neurosci* **21**, 5079-88 (2001).
43. Auger, C. & Attwell, D. Fast removal of synaptic glutamate by postsynaptic transporters. *Neuron* **28**, 547-58 (2000).
44. Yoshii, A., Sheng, M.H. & Constantine-Paton, M. Eye opening induces a rapid dendritic localization of PSD-95 in central visual neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1334-9 (2003).
45. Townsend, M., Yoshii, A., Mishina, M. & Constantine-Paton, M. Developmental loss of miniature N-methyl-D-aspartate receptor currents in NR2A knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1340-5 (2003).
46. Philpot, B.D., Cho, K.K.A. & Bear, M.F. Obligatory Role of NR2A for Metaplasticity in Visual Cortex. *Neuron* **53**, 495-502 (2007).
47. Perez-Otano, I. & Ehlers, M.D. Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci* **28**, 229-38 (2005).
48. Nong, Y., Huang, Y.Q. & Salter, M.W. NMDA receptors are movin' in. *Curr Opin Neurobiol* **14**, 353-61 (2004).
49. Lavezzari, G., McCallum, J., Dewey, C.M. & Roche, K.W. Subunit-specific regulation of NMDA receptor endocytosis. *J Neurosci* **24**, 6383-91 (2004).
50. Lavezzari, G., McCallum, J., Lee, R. & Roche, K.W. Differential binding of the AP-2 adaptor complex and PSD-95 to the C-terminus of the NMDA receptor subunit NR2B regulates surface expression. *Neuropharmacology* **45**, 729-37 (2003).
51. Roche, K.W. et al. Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat Neurosci* **4**, 794-802 (2001).
52. Scott, D.B., Michailidis, I., Mu, Y., Logothetis, D. & Ehlers, M.D. Endocytosis and degradative sorting of NMDA receptors by conserved membrane-proximal signals. *J Neurosci* **24**, 7096-109 (2004).
53. Vissel, B., Krupp, J.J., Heinemann, S.F. & Westbrook, G.L. A use-dependent tyrosine dephosphorylation of NMDA receptors is independent of ion flux. *Nat Neurosci* **4**, 587-96 (2001).
54. Fong, D.K., Rao, A., Crump, F.T. & Craig, A.M. Rapid synaptic remodeling by protein kinase C: reciprocal translocation of NMDA receptors and calcium/calmodulin-dependent kinase II. *J Neurosci* **22**, 2153-64 (2002).
55. Groc, L. et al. Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* **7**, 695-6 (2004).
56. Edidin, M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 414-8 (2003).
57. Radeva, G. & Sharom, F.J. Isolation and characterization of lipid rafts with different properties from RBL-2H3 (rat basophilic leukaemia) cells. *Biochem J* **380**, 219-30 (2004).
58. Rodgers, W. & Smith, K. Properties of glycolipid-enriched membrane rafts in antigen presentation. *Crit Rev Immunol* **25**, 19-30 (2005).
59. Abulrob, A. et al. Protection by cholesterol-extracting cyclodextrins: a role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution. *J Neurochem* **92**, 1477-86 (2005).

60. Ma, L. et al. Ligand-dependent recruitment of the ErbB4 signaling complex into neuronal lipid rafts. *J Neurosci* **23**, 3164-75 (2003).
61. Suzuki, T. et al. Biochemical evidence for localization of AMPA-type glutamate receptor subunits in the dendritic raft. *Brain Res Mol Brain Res* **89**, 20-8 (2001).
62. Becher, A., White, J.H. & McIlhinney, R.A. The gamma-aminobutyric acid receptor B, but not the metabotropic glutamate receptor type-1, associates with lipid rafts in the rat cerebellum. *J Neurochem* **79**, 787-95 (2001).
63. Marta, C.B. et al. Antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein leads to its rapid repartitioning into detergent-insoluble fractions, and altered protein phosphorylation and cell morphology. *J Neurosci* **23**, 5461-71 (2003).
64. Rodriguez, R., Matsuda, M., Storey, A. & Katan, M. Requirements for distinct steps of phospholipase Cgamma2 regulation, membrane-raft-dependent targeting and subsequent enzyme activation in B-cell signalling. *Biochem J* **374**, 269-80 (2003).
65. Chung, J.B., Baumeister, M.A. & Monroe, J.G. Cutting edge: differential sequestration of plasma membrane-associated B cell antigen receptor in mature and immature B cells into glycosphingolipid-enriched domains. *J Immunol* **166**, 736-40 (2001).
66. Weintraub, B.C. et al. Entry of B cell receptor into signaling domains is inhibited in tolerant B cells. *J Exp Med* **191**, 1443-8 (2000).
67. Besshoh, S., Bawa, D., Teves, L., Wallace, M.C. & Gurd, J.W. Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. *J Neurochem* **93**, 186-94 (2005).
68. Guirland, C., Suzuki, S., Kojima, M., Lu, B. & Zheng, J.Q. Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron* **42**, 51-62 (2004).
69. Zhao, W.Q., Waisman, D.M. & Grimaldi, M. Specific localization of the annexin II heterotetramer in brain lipid raft fractions and its changes in spatial learning. *J Neurochem* **90**, 609-20 (2004).
70. Mukherjee, A., Arnaud, L. & Cooper, J.A. Lipid-dependent recruitment of neuronal Src to lipid rafts in the brain. *J Biol Chem* **278**, 40806-14 (2003).
71. Hering, H., Lin, C.C. & Sheng, M. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci* **23**, 3262-71 (2003).
72. Takebayashi, M., Hayashi, T. & Su, T.P. Sigma-1 receptors potentiate epidermal growth factor signaling towards neuritogenesis in PC12 cells: potential relation to lipid raft reconstitution. *Synapse* **53**, 90-103 (2004).
73. Yanagisawa, M., Nakamura, K. & Taga, T. Roles of lipid rafts in integrin-dependent adhesion and gp130 signalling pathway in mouse embryonic neural precursor cells. *Genes to Cells* **9**, 801-809 (2004).
74. Tooze, S., Seethaler, G. & Shields, D. The art of protein sorting: Meeting report from the Annaberg Meeting, Goldegg, Austria, 9-13 January 2001. *Traffic* **2**, 358-61 (2001).
75. Lee, S.J. et al. A detergent-insoluble membrane compartment contains A beta in vivo. *Nat Med* **4**, 730-4 (1998).
76. Bouillot, C., Prochiantz, A., Rougon, G. & Allinquant, B. Axonal Amyloid Precursor Protein Expressed by Neurons in Vitro Is Present in a Membrane Fraction with Caveolae-like Properties. *J. Biol. Chem.* **271**, 7640-7644 (1996).
77. Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C. & Simons, K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer {beta}-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* **160**, 113-123 (2003).

78. Vetrivel, K.S. et al. Association of γ -Secretase with Lipid Rafts in Post-Golgi and Endosome Membranes. *J. Biol. Chem.* **279**, 44945-44954 (2004).
79. Baron, H. Research strategies for evaluation of prion partitioning in plasma fractionation: impact of different forms of prion spike on partitioning behaviour. *Dev Biol (Basel)* **108**, 99-109 (2002).
80. Brugger, B. et al. The Membrane Domains Occupied by Glycosylphosphatidylinositol-anchored Prion Protein and Thy-1 Differ in Lipid Composition. *J. Biol. Chem.* **279**, 7530-7536 (2004).
81. Sanghera, N. & Pinheiro, T.J. Binding of prion protein to lipid membranes and implications for prion conversion. *J Mol Biol* **315**, 1241-56 (2002).
82. Bruckner, K. et al. EphrinB ligands recruit GRIP family PDZ adaptor proteins into raft membrane microdomains. *Neuron* **22**, 511-24 (1999).
83. Davy, A. et al. Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Dev.* **13**, 3125-3135 (1999).
84. Palmer, A. et al. EphrinB Phosphorylation and Reverse Signaling: Regulation by Src Kinases and PTP-BL Phosphatase. *Molecular Cell* **9**, 725-737 (2002).
85. Delling, M. et al. The Neural Cell Adhesion Molecule Regulates Cell-Surface Delivery of G-Protein-Activated Inwardly Rectifying Potassium Channels Via Lipid Rafts. *J. Neurosci.* **22**, 7154-7164 (2002).
86. Niethammer, P. et al. Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *J. Cell Biol.* **157**, 521-532 (2002).
87. Herincs, Z. et al. DCC association with lipid rafts is required for netrin-1-mediated axon guidance. *J Cell Sci* **118**, 1687-1692 (2005).
88. Tansey, M.G., Baloh, R.H., Milbrandt, J. & Johnson, J., Eugene M. GFR[alpha]-Mediated Localization of RET to Lipid Rafts Is Required for Effective Downstream Signaling, Differentiation, and Neuronal Survival. *Neuron* **25**, 611-623 (2000).
89. Pierchala, B.A., Milbrandt, J. & Johnson, E.M., Jr. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor-Dependent Recruitment of Ret into Lipid Rafts Enhances Signaling by Partitioning Ret from Proteasome-Dependent Degradation. *J. Neurosci.* **26**, 2777-2787 (2006).
90. Swaminathan, G. & Tsygankov, A.Y. The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling. *J Cell Physiol* **209**, 21-43 (2006).
91. Gelman, I.H. Pyk 2 FAKs, any two FAKs. *Cell Biol Int* **27**, 507-10 (2003).
92. Mitsuda, T. et al. Overexpression of Ganglioside GM1 Results in the Dispersion of Platelet-derived Growth Factor Receptor from Glycolipid-enriched Microdomains and in the Suppression of Cell Growth Signals. *J. Biol. Chem.* **277**, 11239-11246 (2002).
93. Nishio, M. et al. Overexpressed GM1 suppresses nerve growth factor (NGF) signals by modulating the intracellular localization of NGF receptors and membrane fluidity in PC12 cells. *J Biol Chem* **279**, 33368-78 (2004).
94. Kasai, A., Shima, T. & Okada, M. Role of Src family tyrosine kinases in the down-regulation of epidermal growth factor signaling in PC12 cells. *Genes to Cells* **10**, 1175-1187 (2005).
95. Asaki, C., Usuda, N., Nakazawa, A., Kametani, K. & Suzuki, T. Localization of translational components at the ultramicroscopic level at postsynaptic sites of the rat brain. *Brain Research* **972**, 168-176 (2003).
96. Pike, L.J. The challenge of lipid rafts. *J Lipid Res* (2008).
97. Pike, L.J. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* **378**, 281-92 (2004).
98. Foger, N., Marhaba, R. & Zoller, M. Involvement of CD44 in cytoskeleton rearrangement and raft reorganization in T cells. *J Cell Sci* **114**, 1169-78 (2001).

99. Yamazaki, M. et al. Differential palmitoylation of two mouse glutamate receptor interacting protein 1 forms with different N-terminal sequences. *Neurosci Lett* **304**, 81-4 (2001).
100. Topinka, J.R. & Brecht, D.S. N-terminal palmitoylation of PSD-95 regulates association with cell membranes and interaction with K⁺ channel Kv1.4. *Neuron* **20**, 125-34 (1998).
101. Dalskov, S.-M. et al. Lipid raft localization of GABAA receptor and Na⁺, K⁺-ATPase in discrete microdomain clusters in rat cerebellar granule cells. *Neurochemistry International* **46**, 489-499 (2005).
102. Bruses, J.L., Chauvet, N. & Rutishauser, U. Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the (alpha)7 nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. *J Neurosci* **21**, 504-12 (2001).
103. Morris, R.G.M., Anderson, E., Lynch, G.S. & Baudry, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *J Neurosci* **319**, 774-776 (1986).
104. Eichenbaum, H., Stewart, C. & Morris, R. Hippocampal representation in place learning. *J. Neurosci.* **10**, 3531-3542 (1990).
105. Davis, S., Butcher, S. & Morris, R. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J. Neurosci.* **12**, 21-34 (1992).
106. Izquierdo, L.A. et al. Novelty enhances retrieval: molecular mechanisms involved in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **13**, 1464-7 (2001).
107. Morris, R. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D- aspartate receptor antagonist AP5. *J. Neurosci.* **9**, 3040-3057 (1989).
108. Tang, Y.P. et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* **401**, 63-9 (1999).
109. Adams, M.M. et al. Hippocampal dependent learning ability correlates with N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor levels in CA3 neurons of young and aged rats. *J Comp Neurol* **432**, 230-43 (2001).
110. Gutierrez, H., Hernandez-Echeagaray, E., Ramirez-Amaya, V. & Bermudez-Rattoni, F. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience* **89**, 751-8 (1999).
111. Krushel, L.A. & van der Kooy, D. Visceral cortex: integration of the mucosal senses with limbic information in the rat agranular insular cortex. *J Comp Neurol* **270**, 39-54, 62-3 (1988).
112. Bermudez-Rattoni, F., Introini-Collison, I.B. & McGaugh, J.L. Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5379-82 (1991).
113. Escobar, M.L., Alcocer, I. & Bermudez-Rattoni, F. In vivo effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion. *Behav Brain Res* **129**, 101-6 (2002).
114. Escobar, M.L., Alcocer, I. & Chao, V. The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo. *Brain Res* **812**, 246-51 (1998).
115. Mizuno, M., Yamada, K., He, J., Nakajima, A. & Nabeshima, T. Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation. *Learn Mem* **10**, 108-15 (2003).

116. Carlin, R.K., Grab, D.J., Cohen, R.S. & Siekevitz, P. Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J Cell Biol* **86**, 831-45 (1980).
117. Cohen, R.S., Blomberg, F., Berzins, K. & Siekevitz, P. The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex. I. Overall morphology and protein composition. *J Cell Biol* **74**, 181-203 (1977).
118. Migaud, M. et al. Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* **396**, 433-9 (1998).
119. Schluter, O.M., Xu, W. & Malenka, R.C. Alternative N-terminal domains of PSD-95 and SAP97 govern activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor function. *Neuron* **51**, 99-111 (2006).
120. Rong, Y., Lu, X., Bernard, A., Khrestchatisky, M. & Baudry, M. Tyrosine phosphorylation of ionotropic glutamate receptors by Fyn or Src differentially modulates their susceptibility to calpain and enhances their binding to spectrin and PSD-95. *J Neurochem* **79**, 382-90 (2001).
121. Kohr, G. & Seeburg, P.H. Subtype-specific regulation of recombinant NMDA receptor-channels by protein tyrosine kinases of the src family. *J Physiol* **492** (Pt 2), 445-52 (1996).
122. Liu, L. et al. Role of NMDA Receptor Subtypes in Governing the Direction of Hippocampal Synaptic Plasticity. *Science* **304**, 1021-1024 (2004).
123. Bartlett, T.E. et al. Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus. *Neuropharmacology LTP: Forty Unforgettable Years. A Festschrift in Honour of Professor Tim Bliss FRS* **52**, 60-70 (2007).
124. Berberich, S. et al. Lack of NMDA Receptor Subtype Selectivity for Hippocampal Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* **25**, 6907-6910 (2005).
125. Clayton, D.A., Mesches, M.H., Alvarez, E., Bickford, P.C. & Browning, M.D. A Hippocampal NR2B Deficit Can Mimic Age-Related Changes in Long-Term Potentiation and Spatial Learning in the Fischer 344 Rat. *J. Neurosci.* **22**, 3628-3637 (2002).
126. Zhao, M.-G. et al. Roles of NMDA NR2B Subtype Receptor in Prefrontal Long-Term Potentiation and Contextual Fear Memory. *Neuron* **47**, 859-872 (2005).
127. Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B. & Seeburg, P.H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **12**, 529-40 (1994).
128. Ritter, L.M., Vazquez, D.M. & Meador-Woodruff, J.H. Ontogeny of ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* **139**, 227-36 (2002).
129. Sheng, M., Cummings, J., Roldan, L.A., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* **368**, 144-7 (1994).
130. Massey, P.V. et al. Differential Roles of NR2A and NR2B-Containing NMDA Receptors in Cortical Long-Term Potentiation and Long-Term Depression. *J. Neurosci.* **24**, 7821-7828 (2004).
131. Lingwood, D. & Simons, K. Detergent resistance as a tool in membrane research. *Nat Protoc* **2**, 2159-65 (2007).
132. Melkonian, K.A., Ostermeyer, A.G., Chen, J.Z., Roth, M.G. & Brown, D.A. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem* **274**, 3910-7 (1999).

133. Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C. & Tsien, R.Y. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**, 913-6 (2002).
134. Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B. & Seeburg, P.H. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* **269**, 1737-40 (1995).
135. Stetzkowski-Marden, F. et al. Rafts are required for acetylcholine receptor clustering. *J Mol Neurosci* **30**, 37-8 (2006).
136. Campagna, J.A. & Fallon, J. Lipid rafts are involved in C95 (4,8) agrin fragment-induced acetylcholine receptor clustering. *Neuroscience* **138**, 123-132 (2006).
137. Marchand, S., Bignami, F., Stetzkowski-Marden, F. & Cartaud, J. The myristoylated protein rapsyn is cotargeted with the nicotinic acetylcholine receptor to the postsynaptic membrane via the exocytic pathway. *J Neurosci* **20**, 521-8 (2000).
138. Zhu, D., Xiong, W.C. & Mei, L. Lipid Rafts Serve as a Signaling Platform for Nicotinic Acetylcholine Receptor Clustering. *J. Neurosci.* **26**, 4841-4851 (2006).
139. Carlisle, H.J., Fink, A.E., Grant, S.G. & O'Dell, T.J. Opposing effects of PSD-93 and PSD-95 on long-term potentiation and spike timing-dependent plasticity. *J Physiol* **586**, 5885-900 (2008).
140. McGee, A.W. et al. PSD-93 knock-out mice reveal that neuronal MAGUKs are not required for development or function of parallel fiber synapses in cerebellum. *J Neurosci* **21**, 3085-91 (2001).
141. Funke, L., Dakoqi, S. & Brecht, D.S. Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu Rev Biochem* **74**, 219-45 (2005).
142. El-Husseini, A.E. et al. Dual palmitoylation of PSD-95 mediates its vesiculotubular sorting, postsynaptic targeting, and ion channel clustering. *J Cell Biol* **148**, 159-72 (2000).
143. El-Husseini, A.E. et al. Ion channel clustering by membrane-associated guanylate kinases. Differential regulation by N-terminal lipid and metal binding motifs. *J Biol Chem* **275**, 23904-10 (2000).
144. Suzuki, S. et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates cholesterol metabolism for synapse development. *J Neurosci* **27**, 6417-27 (2007).
145. Sprengel, R. et al. Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell* **92**, 279-89 (1998).
146. Suzuki, T., Du, F., Tian, Q.B., Zhang, J. & Endo, S. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II α clusters are associated with stable lipid rafts and their formation traps PSD-95. *J Neurochem* **104**, 596-610 (2008).
147. Strack, S., Robison, A.J., Bass, M.A. & Colbran, R.J. Association of calcium/calmodulin-dependent kinase II with developmentally regulated splice variants of the postsynaptic density protein densin-180. *J Biol Chem* **275**, 25061-4 (2000).
148. Strack, S., McNeill, R.B. & Colbran, R.J. Mechanism and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II targeting to the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* **275**, 23798-806 (2000).
149. Zhou, Y. et al. Interactions between the NR2B receptor and CaMKII modulate synaptic plasticity and spatial learning. *J Neurosci* **27**, 13843-53 (2007).
150. Steigerwald, F. et al. C-Terminal truncation of NR2A subunits impairs synaptic but not extrasynaptic localization of NMDA receptors. *J Neurosci* **20**, 4573-81 (2000).