

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**Activación de la vía de las MAP cinasas ERK 1/2
por el glutamato en las células del epitelio
pigmentado de la retina**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA LA BIÓLOGA

SOFÍA GARCÍA HERNÁNDEZ

Directora de tesis: Dra. Ana María López Colomé

Comité tutorial: Dra. Clorinda Arias Álvarez

Dr. Fernando López Casillas



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

A la Dra. Ana María López Colomé, por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, y por todas las horas de discusión en beneficio de mi formación profesional.

A los miembros del Comité tutorial, la Dra. Clorinda Arias Álvarez y el Dr. Fernando López Casillas, por su apoyo en mi formación académica durante el doctorado.

A la Dra. Martha Robles Flores, por su asistencia como suplente y su aportación al proyecto en dos exámenes tutorales.

A los miembros del jurado: Dra. Carmen Clapp Jiménez, Dra. Marina Macías Silva, Dra. Martha Robles Flores, y Dra. Claudia González Espinoza, por sus valiosas sugerencias y aportaciones en la elaboración de esta tesis.

A la Q.F.B. Edith López Hernández, al M. en C. José Prisco Palma Nicolás, y a la Dra. Irene Lee Rivera, por su excelente apoyo técnico.

Este trabajo se llevó a cabo en el departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Ana María López Colomé.

La investigación fue parcialmente financiada por donativos otorgados a la Dra. López Colomé, por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 42640-Q), y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM, IN228203).

Durante el Doctorado se otorgó la beca de CONACyT (registro 188812) y DGEP a Sofía García Hernández.

El Comité tutorial estuvo conformado por la Dra. Clorinda Arias Álvarez, el Dr. Fernando López Casillas y la Dra. Ana María López Colomé.

El jurado del exámen de grado estuvo conformado por las Doctoras Carmen Clapp Jiménez, Marina Macías Silva, Martha Robles Flores, Claudia González Espinoza y Ana María López Colomé.

“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir”

Albert Einstein.

INDICE

PAGINA

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	5
ABSTRACT	7
INTRODUCCION	
Organización de la retina	9
Epitelio pigmentado de la retina	10
Vitreorretinopatía proliferativa	13
Receptores de glutamato	
<i>Receptores de AMPA</i>	<i>17</i>
<i>Receptores de Kainato</i>	<i>18</i>
<i>Receptores de NMDA</i>	<i>19</i>
<i>Receptores metabotrópicos</i>	<i>21</i>
MAP cinasas	
<i>Descripción de la vía de ERK1/2</i>	<i>23</i>
<i>Sustratos de ERK1/2</i>	<i>26</i>
<i>Activación del factor de transcripción CREB</i>	<i>27</i>
<i>Cinasas que activan a CREB</i>	<i>30</i>
<i>Activación de Raf/MEK/ERK por otras cinasas</i>	<i>31</i>
<i>Activación de ERK1/2 por GluR</i>	<i>32</i>
ANTECEDENTES	34
HIPOTESIS	34
OBJETIVOS	34
MATERIALES Y METODOS	

<i>Cultivo de células de EPR</i>	35
<i>Ensayos de proliferación celular</i>	36
<i>Protocolo de estimulación de ERK</i>	36
<i>Inmunoprecipitación de ERK</i>	37
<i>Ensayo de activación de ERK1/2</i>	37
<i>Western Blot</i>	38
RESULTADOS	
<i>La activación de los receptores de glutamato aumenta la proliferación de las células del EPR</i>	39
<i>La proliferación inducida por glutamato se inhibe con antagonistas específicos de los subtipos de receptores</i>	41
<i>La activación de los receptores de glutamato estimula la fosforilación de ERK1/2</i>	42
<i>La activación de ERK1/2 se requiere para la proliferación del EPR inducida por glutamato</i>	44
<i>La proliferación del EPR inducida por glutamato involucra a las CaMK</i>	44
<i>El glutamato estimula la fosforilación de CREB mediante la activación de ERK1/2</i>	45
DISCUSION	51
CONCLUSION	58
RELEVANCIA	59
REFERENCIAS	60
ARTICULO	73

ABREVIATURAS

ACPD	Ácido-1-aminociclopentano dicarboxílico
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
Calcineurina	Fosfatasa de proteína 2B
CaMK II	Cinasas dependientes de Ca^{2+} /Calmodulina II
CBP	Proteína de unión a CREB
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
cPLA ₂	Fosfolipasa citoplásmica A ₂
CRALBP	Proteína celular de unión a retinal
CRD	Dominio rico en cisteína
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
DAG	Diacilglicerol
DNQX	6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona
DSP	Fosfatasa de especificidad dual
EPR	Epitelio pigmentado de la retina
ERK 1/2	Cinasas de proteína reguladas por señales extracelulares 1 y 2
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GDP	Guanosín difosfato
GEF	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
GTP	Guanosín trifosfato
iGluR	Receptores de glutamato ionotrópicos
IP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
KA	Ácido kaínico (2-carboxi-3-carboximetil-4-isopropenilpirrolidina)
KN-62	Inhibidor general de las cinasas dependientes de Ca^{2+} /calmodulina
KSR	Cinasa supresora de Raf
LRAT	Lecitina acil transferasa del retinol
MAPK	Cinasa de proteína activada por mitógeno

MCPG	α -metil-4- carboxifelilglicina
MEK	Cinasa de las MAP cinasas ERK
mGluR	Receptores de glutamato metabotrópicos
MK	Cinasa activada por MAPK
MK-801	Maleato de dizocilpina
MKP	Fosfatasas de MAP cinasas
MSK I	Cinasa activada por mitógenos y por estrés I
NBQX	2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfaoil-benzo(F)quinoxalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
p90 ^{RSK}	Cinasa de la subunidad ribosomal S6 de 90 kDa
PD98059	Inhibidor de MEK 1/2
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PKA	Cinasa de proteína A
PKC	cinasa de proteína C
PLC	Fosfolipasa C
PP1	Fosfatasa de proteína 1
PP2A	Fosfatasa de proteína 2A
PP2B	Fosfatasa de proteína 2B o Calcineurina
PTP	Fosfatasa de tirosina
PTX	Toxina pertusis
RBD	Dominio de unión a Ras
RDH5	11- <i>cis</i> -retinol-deshidrogenasa tipo 5
RTK	Receptores con actividad de cinasa de tirosina
SNC	Sistema nervioso central
SRE	Elemento de respuesta al suero
SRF	Factor de respuesta al suero
STEP	Fosfatasa de tirosina abundante en el estriado
VRP	Vitreorretinopatía proliferativa

RESUMEN

El epitelio pigmentado de la retina (EPR) es una monocapa de células poligonales situada entre la retina y la coroides, formando parte de la barrera hematorretiniana; su funcionamiento adecuado es esencial para el mantenimiento íntegro de la estructura y función de la retina neural. La proliferación y la migración aberrante de las células del EPR como resultado de la transición epitelio-mesénquima juegan un papel clave en la vitreorretinopatía proliferativa (VRP), padecimiento que conduce al desprendimiento de la retina y la pérdida de la visión debido a la formación de membranas contráctiles en la cavidad vítrea. Se ha reportado la presencia de receptores funcionales de glutamato (GluR) tanto ionotrópicos como metabotrópicos en el EPR. Se ha demostrado que, en neuronas, el glutamato activa la vía de señalamiento Ras/Raf/MEK/ERK, la cual interviene en la regulación de procesos tan diversos como proliferación, diferenciación y sobrevivencia. Aunque se ha demostrado que la estimulación con glutamato y la activación de ERK 1/2 por diferentes estímulos promueven la proliferación celular, las vías de señalamiento que unen estos efectos no se han caracterizado. Dado que la estimulación de los GluR y la activación de ERK 1/2 por glutamato estimulan la proliferación, es posible proponer su intervención en el desarrollo de la VRP. El propósito de este trabajo fue analizar el efecto del glutamato sobre la activación de ERK 1/2, como un posible mecanismo de inducción de la proliferación de las células del EPR. Se evaluó la proliferación mediante la incorporación de [³H]-timidina y se analizó el mecanismo molecular que lleva a la proliferación inducida por glutamato mediante la determinación de la fosforilación de ERK 1/2 y de CREB en cultivos primarios de células de EPR de pollo y en la línea celular derivada de humano ARPE-19. En este trabajo se estudió la proliferación de las células del EPR promovida por el glutamato mediante la activación de dos vías de señalamiento diferentes vinculadas con los receptores metabotrópicos (mGluR) y los ionotrópicos del tipo NMDA (NMDAR). Los resultados demuestran que el glutamato estimula la proliferación de las células del EPR, así como la fosforilación de ERK y de CREB. Los agonistas para los mGluR (ACPD) y para los NMDAR tuvieron un efecto positivo sobre la proliferación y la fosforilación, y se bloquearon con los antagonistas respectivos para cada subtipo de receptor,

MCPG y MK-801, indicando la relación causa-efecto entre estos procesos. Mientras que la proliferación promovida por los mGluR está mediada por la activación de la cascada MEK/ERK/CREB, la proliferación inducida por los NMDAR es a través de las cinasas dependientes de Ca^{2+} /CaM (CaMK), independiente de MEK 1/2. El bloqueo de la proliferación con el KN-62 sugiere que las CaMK están involucradas en el control de la proliferación inducida por glutamato en un paso común a nivel del núcleo, posiblemente para regular la progresión del ciclo celular. Con base en estos resultados, se propone que es necesario considerar la participación del glutamato en el desarrollo de la vitreorretinopatía proliferativa.

ABSTRACT

The retinal pigment epithelium (RPE) is a monolayer of pigmented cells forming part of the blood-retina barrier (BRB) and plays an essential role in the function and maintenance of the neural retina. The abnormal proliferation and migration of RPE cells, resulting from an epithelial-mesenchymal transition, plays a key role in proliferative vitreoretinopathy, which leads to retinal detachment and the loss of vision. Functional ionotropic and metabotropic glutamate receptors (GluRs) have been characterized in RPE cells. In neurons, glutamate has been shown to activate the Ras/Raf/MEK/ERK cascade, which participates in the regulation of proliferation, differentiation and survival processes. Although glutamate-stimulation and activation of ERK 1/2 by different stimuli have been shown to promote RPE cell proliferation, the signaling pathway(s) linking these effects has not been established.

The present study was aimed to analyze the effect of glutamate on the activation of the ERK 1/2 cascade as a possible mechanism involved in the induction of RPE proliferation. Using chick RPE cells in primary culture and human-derived ARPE-19 cell line as model systems, we analyzed the molecular mechanisms leading to glutamate-induced proliferation by determining ERK 1/2 and CREB phosphorylation.

This study shows that glutamate promotes RPE cell proliferation by activating two distinct signaling pathways linked to selective glutamate receptor subtypes. Results demonstrate that glutamate stimulates RPE cell proliferation by increasing ERK 1/2 activation, which, in turn, phosphorylates the transcription factor CREB. These effects were mimicked by the mGluR agonist ACPD and by NMDA, and were prevented by the respective receptor inhibitors MCPG and MK-801, indicating a cause-effect relationship between proliferation and ERK 1/2 phosphorylation. Whereas mGluR promoted proliferation by activating the MEK/ERK/CREB cascade, NMDA stimulated proliferation through a MEK-independent activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinases. Blockage of both proliferation-signaling pathways by KN-62 suggests the involvement of CaMKs in the control of glutamate-induced proliferation at a common step, within the nucleus,

possibly the regulation of cell cycle progression. These results thus suggest that under pathological conditions or surgical procedures in which the BRB is compromised, the elevation of extracellular glutamate may be involved in the alteration of gene expression leading to the increase in RPE cell proliferation, as observed in PVR.

INTRODUCCIÓN

Organización de la retina

La retina de los vertebrados, como parte del sistema nervioso central (SNC), deriva del neuroectodermo durante el desarrollo embrionario. Se sitúa en la región posterior del ojo, adosada al epitelio pigmentado de la retina (EPR; figura 1). La retina tiene una organización estratificada que consta de cinco tipos de neuronas: fotorreceptores, células bipolares, células horizontales, células amacrinas y células ganglionares. En la capa plexiforme externa hacen contacto sináptico los fotorreceptores con las células bipolares y las horizontales; en la capa plexiforme interna hacen sinapsis las células bipolares con las ganglionares y las amacrinas. Las células horizontales y las amacrinas modulan la transmisión sináptica glutamatérgica, que va desde los fotorreceptores hasta las células ganglionares (vía vertical), ya que esta vía lateral usa ácido- γ -aminobutírico (GABA) como principal neurotransmisor inhibitorio (Dowling, 1987; Thoreson y Witkovsky, 1999).

Dos tipos de glía modulan la neurotransmisión en la retina, las células de Müller y los astrocitos (Newman, 2004). Los astrocitos se localizan en la capa interna de la retina, junto a las células ganglionares, rodeando a los capilares de las retinas vascularizadas. La glía de Müller atraviesa radialmente la retina y se ramifica en las capas plexiformes envolviendo a las sinapsis. La función principal de las células gliales es modular la transmisión sináptica en la retina mediante varios mecanismos: liberación de neurotransmisores, inhibición de las células ganglionares mediante la liberación de ATP, captura de glutamato y liberación de D-serina por la glía de Müller y regulación de los niveles de K^+ y H^+ (Newman, 2004). Ambos tipos de glía forman parte de la barrera hematorretiniana.

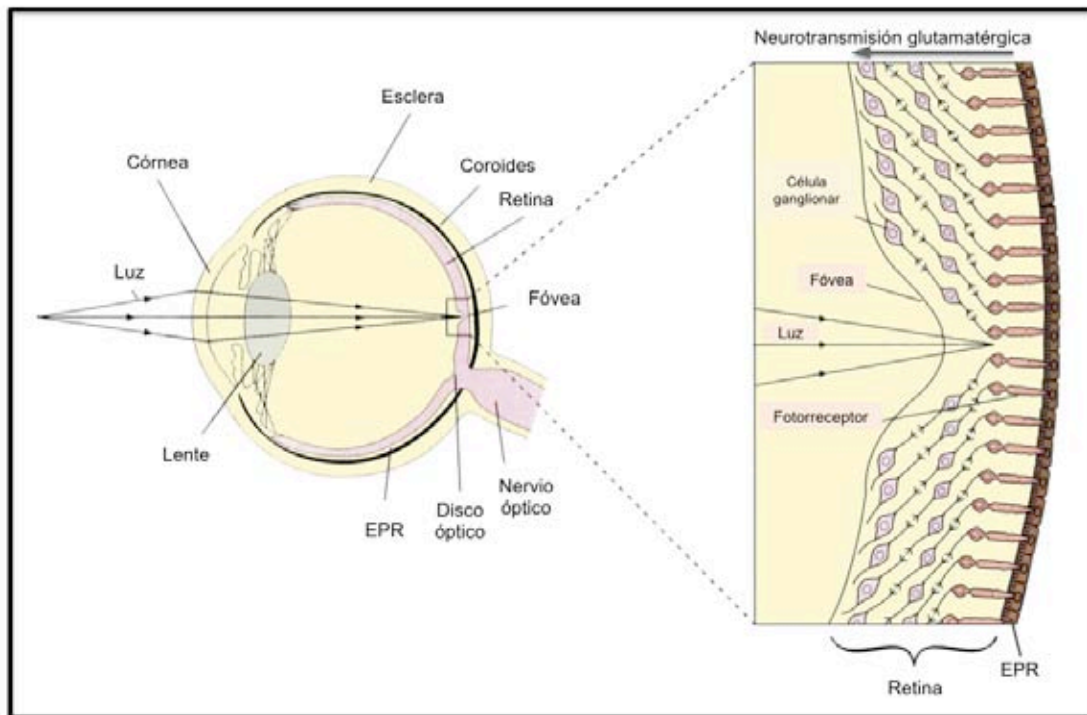


Figura I. Ubicación de la retina en el ojo. La retina se sitúa en región posterir del ojo, haciendo contacto con el epitelio pigmentado de la retina (EPR). Modificado de Kandel et al., 2000.

Epitelio Pigmentado de la Retina

El epitelio pigmentado de la retina (EPR) es una monocapa de células poligonales situada entre la coroides y la retina neural, recubriendo el fondo del ojo; se deriva embriológicamente del neuroectodermo. Mientras que la retina se diferencia en varias capas de neuronas, el EPR permanece como una monocapa de células epiteliales. Cada célula tiene un diámetro de 10 a 14 μ en la región macular, y hasta 60 μ en la periferia (Marmor, 1998). La membrana apical forma procesos que se interdigitan con los segmentos externos de los fotorreceptores en el espacio subretinal. La membrana basolateral hace contacto con la membrana de Bruch, que separa al EPR del endotelio de los coriocapilares (Strauss, 2005; Hughes, 1998) (Figura II).

El EPR es de vital importancia en el mantenimiento íntegro de la estructura y función de la retina neural debido a su capacidad de secretar varios factores de

crecimiento (Strauss, 2005); su presencia es esencial para la estratificación correcta de la retina (Wolburg et al., 1991; Bytyqi et al., 2007).

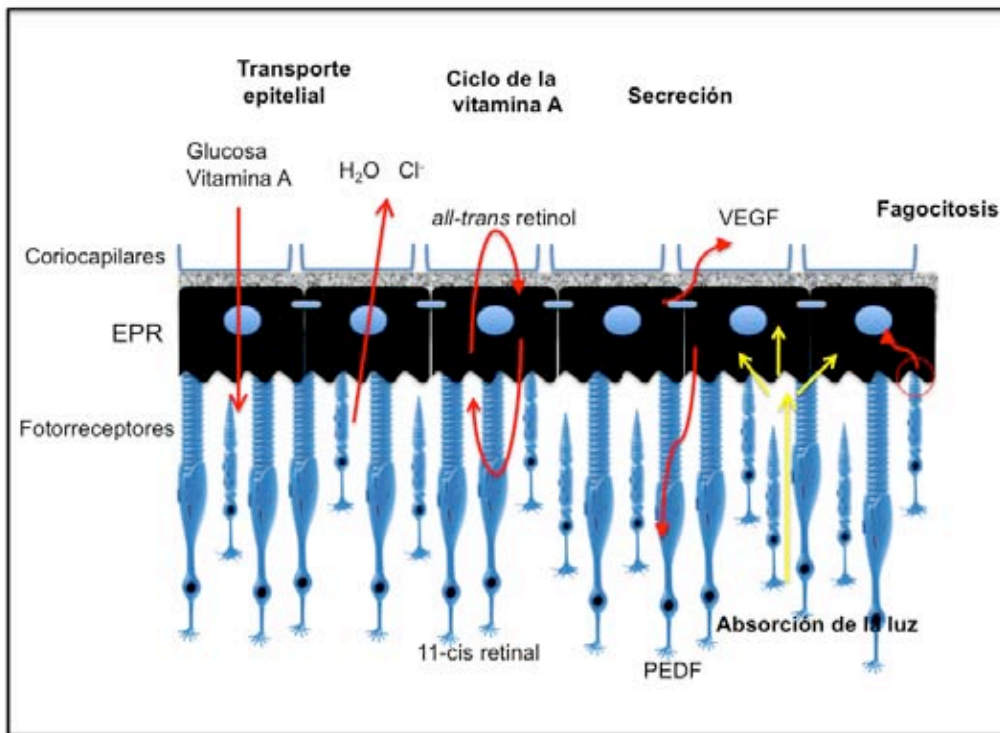


Figura II. Funciones principales del epitelio pigmentado de la retina (EPR; Strauss, 2005). PEDF, factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentado; VEGF, factor de crecimiento del endotelio vascular.

El EPR renueva los segmentos externos de los fotorreceptores, gracias a su capacidad de fagocitarlos rítmicamente bajo un oscilador circadiano (Nguyen-Legros y Hicks, 2000). Dado que las células fotorreceptoras no se dividen mitóticamente, renuevan constantemente a las membranas fotosensibles de los segmentos externos, desplazando a los segmentos viejos hacia el extremo externo para ser fagocitados y degradados por el EPR (Young y Bok, 1969; Besharse y Defoe, 1998). Se ha estimado que el EPR degrada alrededor de 25 000 discos de los segmentos externos de los fotorreceptores diariamente y que la captura de los discos y su degradación se lleva a cabo eficientemente en unas horas (Ershov y Bazan, 2000).

El EPR participa en el ciclo visual. Su función básica es la isomerización del *all-trans* retinol a *11-cis*-retinal. El *all-trans* retinol o vitamina A, proveniente de

la sangre a través de la circulación coroidal, entra por la membrana basal del EPR. Este mismo retinoide, proveniente de los fotorreceptores, se adquiere por la fagocitosis de los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores. En las células del EPR, la lecitina acil transferasa del retinol (LRAT) esterifica al *all-trans*-retinol para formar *all-trans*-retinil ester. La isomerohidrolasa RPE65 convierte al *all-trans*-retinil ester en 11-*cis*-retinol. La oxidación del 11-*cis*-retinol se lleva a cabo por la 11-*cis*-retinol-deshidrogenasa tipo 5 (RDH5) para originar 11-*cis*-retinal. Este último se libera del EPR a la matriz interfotorreceptora, unido a la proteína celular de unión a retinal (CRALBP), para llegar a los fotorreceptores mediante un mecanismo desconocido. El 11-*cis*-retinal, que es el cromóforo fotosensible, se une covalentemente a la opsina de los fotorreceptores para formar la rodopsina y la conopsina, proteínas integrales de membrana que se activan por los fotones e inician la transducción de señales (Thompson, 2003; Travis et al., 2007).

El EPR protege a la retina del daño fótico gracias a que contiene varios pigmentos especializados en la absorción de la luz de diferentes longitudes de onda, principalmente la melanina. Además, contiene antioxidantes que protegen a los fotorreceptores de la foto-oxidación y de las especies de oxígeno reactivas generadas por la luz. Tales antioxidantes son la superóxido dismutasa y la catalasa, así como algunos carotenoides (Strauss, 2005; Boulton y Dayhaw-Barker, 2001).

El EPR forma parte importante, estructural y funcional (figura II), de la barrera hematorretiniana. Las células del EPR forman uniones estrechas entre ellas que, junto con el endotelio de los coriocapilares, impiden eficientemente el intercambio de sustancias tóxicas entre la circulación coroidal y la retina neural, creando un microambiente en el que se modulan las respuestas inmunes (Liversidge y Forrester, 1998) mediante la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, de moléculas de adhesión y citocinas (Holtkamp et al., 2001). Dado que los fotorreceptores no están en contacto directo con la sangre, el EPR transporta glucosa, vitamina A y otros nutrientes de la sangre a los fotorreceptores. Además, transporta iones y agua del espacio subretinal a la coroides. Este flujo bidireccional mantiene la homeostasis de la retina (Hughes et al., 1998). La integridad de la barrera hematorretiniana es de vital importancia ya que la interrupción de la misma

puede conducir a retinopatías tales como la vitreorretinopatía proliferativa (VRP; Jin et al., 2002; Nagasaki et al., 1998).

Vitreorretinopatía proliferativa

La vitreorretinopatía proliferativa (VRP) se define como un proceso de cicatrización anormal que se desarrolla en 5 a 10 por ciento de los casos de desprendimiento de la retina. También se define como el crecimiento y contracción de membranas celulares en la cavidad vítrea y en la superficie epirretinal y subretinal; es la causa principal del fracaso de las cirugías como tratamiento del desprendimiento regmatógeno de la retina. Se asocia con hemorragia intraocular durante la cirugía de la retina y se relaciona con procesos de inflamación, por lo que se le llama VRP post-operatoria. Sin embargo, en algunos casos la VRP se presenta antes de una intervención quirúrgica, a ésta se le llama VRP primaria o pre-operatoria (Pastor et al., 2002), pero la incidencia es mayor después de una cirugía.

Las membranas formadas durante la VRP se componen de células del EPR, células gliales (Müller y astrocitos), fibroblastos y células inflamatorias (macrófagos y linfocitos; figura III B). Las células del EPR se consideran un elemento clave durante el desarrollo de la VRP ya que están presentes casi en el 100% de las membranas y son las principales productoras de fibras de colágena (Pastor et al., 2002). En estado adulto, estas células están diferenciadas, con las características previamente descritas, y no se dividen. Al parecer, la pérdida del contacto retina-EPR es el estímulo que lleva a la desdiferenciación del EPR (Campochiaro, 1997 en Abe et al, 1998). La desdiferenciación de la superficie apical de estas células es el primer cambio morfológico que sufren después del desprendimiento de la retina, ya que los procesos apicales desaparecen rápidamente (24 horas después del desprendimiento regmatógeno experimental) (Fisher y Anderson, 1998). Asimismo, las células del EPR empiezan a proliferar (Fisher et al, 1991) y a migrar al espacio subretinal. La proliferación se limita al área de desprendimiento de la retina; al parecer, la unión del EPR con la retina neural es suficiente para mantener a las células del EPR mitóticamente inactivas

(Campochiaro, 1997). Su separación induce respuestas intracelulares en las células del EPR que conducen a la entrada del ciclo celular o bien, a la liberación local de factores de crecimiento que estimulan la proliferación de las células del EPR separadas de la retina neural (Fisher et al., 1991).

La desdiferenciación de las células del EPR se puede explicar como una transición epitelio-mesénquima (Casaroli-Marano et al., 1999), en donde las células se separan del epitelio y adquieren propiedades migratorias, al modificar la organización del citoesqueleto y su interacción con la matriz extracelular (Birchmeier, 1993).

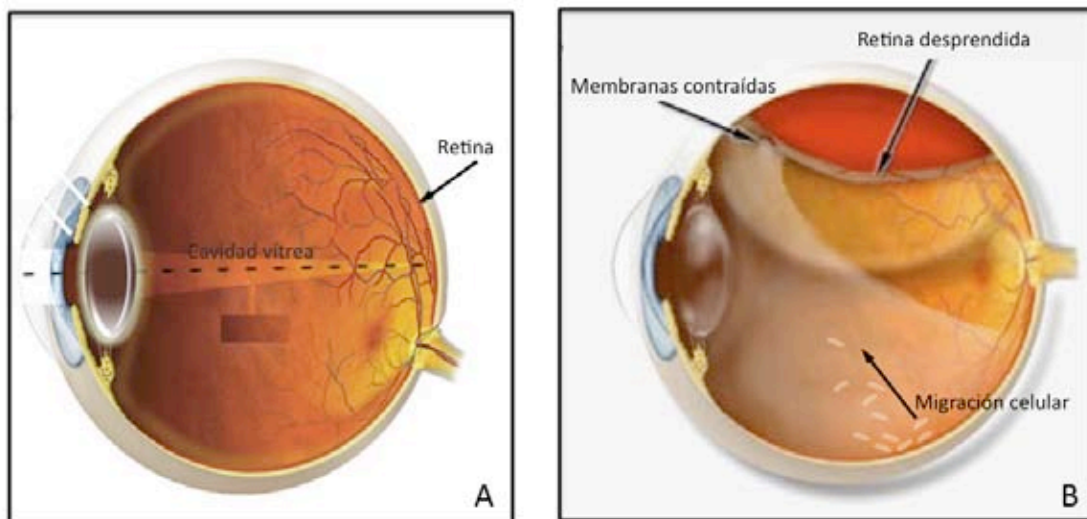


Figura III. Vitreorretinopatía proliferativa. Se muestra un ojo sano (A) y uno con VRP. Las membranas formadas en la cavidad vítrea y en la superficie de la retina se componen de células del EPR, células gliales, fibroblastos y células inflamatorias, que ejercen tracción sobre la retina (B). Imagen modificada de http://www.saryv.org.ar/images/cont_cient1_02.jpg.

Aunque la VRP es un proceso dinámico, se tiene muy poca información acerca de su cronobiología (Pastor et al., 2002); sin embargo, se ha propuesto una secuencia de eventos celulares durante el desarrollo de esta enfermedad: primero, las células del EPR pierden su morfología poligonal y adquieren características de miofibroblastos; también pasan de un estado quiescente a dividirse activamente. Esta transformación epitelio-mesénquima confiere a las células la capacidad de migrar del espacio subretinal hacia la cavidad vítrea,

en donde proliferan extensamente y forman membranas que ejercen fuerza contráctil sobre la retina causando su desprendimiento y, posteriormente, la pérdida de la visión (Ando et al., 2000; Walshe et al., 1992).

Las células del EPR desdiferenciadas secretan factores de crecimiento (Campochiaro, 1998) y citocinas (Holtkamp et al., 2001) que contribuyen a la proliferación y migración durante la VRP, entre ellos la IL-6, el TGF- β , el PDGF, el FGF, el HGF (Grierson et al., 2000; Jin et al., 2002) y el bFGF (Kon et al., 1999). Éste último, inducido por glutamato, aumenta su expresión e incrementa la proliferación de las células del EPR (Uchida et al., 1998).

Se ha demostrado experimentalmente que durante el desprendimiento de la retina, uno de los primeros cambios producidos es la alteración del sistema glutamatérgico (Sherry y Townes-Anderson, 2000), ya que la concentración de glutamato en el EPR y en la glía de Müller alcanza concentraciones milimolares después del desprendimiento de la retina (Marc et al., 2004). Este aumento en la concentración de glutamato se ha detectado también en el vítreo de pacientes con desprendimiento de la retina (Diederer et al., 2006; Barber, 2003). Asimismo, se han identificado y caracterizado receptores específicos de glutamato en células de EPR de pollo (López-colomé et al., 1993) y de humano (López-colomé et al., 1994).

Receptores de glutamato

El glutamato (Glu) es el principal aminoácido excitador en el sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados. Se ha demostrado que juega un papel importante en el desarrollo neuronal, en la plasticidad sináptica, la memoria y el aprendizaje, así como en procesos de excitotoxicidad y en enfermedades neurodegenerativas. Para llevar a cabo sus múltiples funciones interacciona con dos tipos principales de receptores clasificados, con base en su estructura, sus propiedades farmacológicas y su mecanismo de transducción de señales, en ionotrópicos y metabotrópicos (Michaelis, 1998).

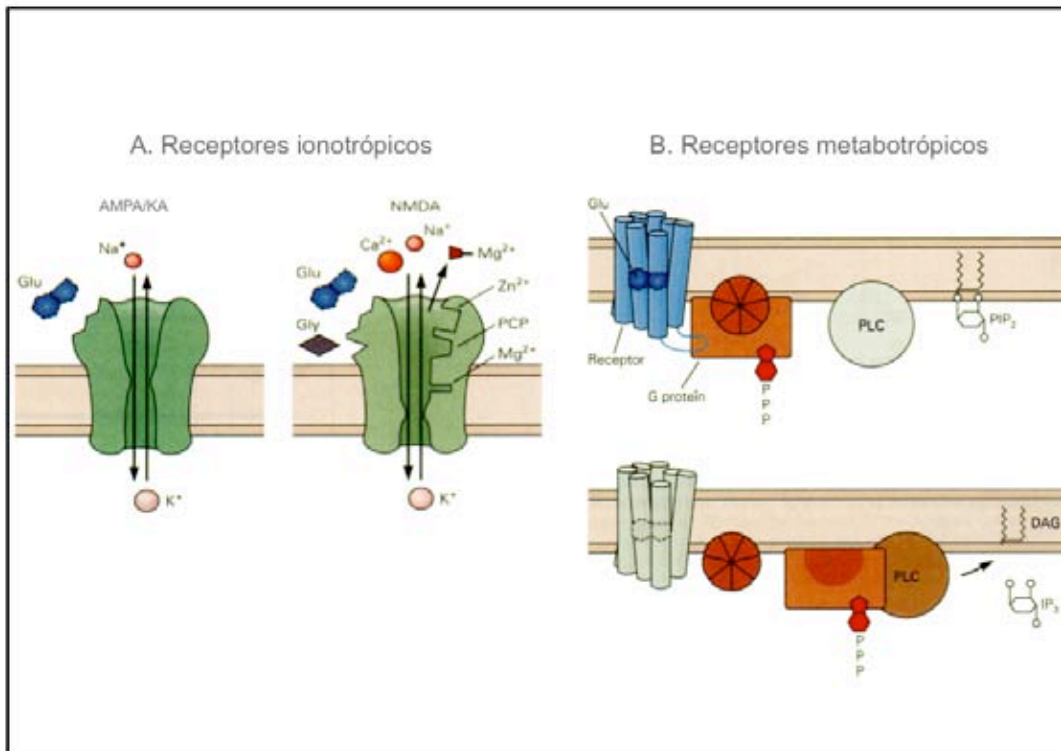


Figura IV. Receptores de glutamato. Los receptores ionotrópicos forman canales catiónicos (A), mientras que los metabotrópicos (B) tienen siete dominios transmembranales y un sitio de unión al ligando. PLC, fosfolipasa C; PIP₂, fosfatidilinositol bifosfato; IP₃, inositol trifosfato; DAG, diacilglicerol. Modificado de Kandel et al., 2000.

Receptores ionotrópicos: su activación y modulación

Los receptores ionotrópicos (iGluR) son canales catiónicos activados por ligando (figura IV) y median la neurotransmisión excitadora rápida en el SNC. Se componen de cuatro subunidades, cada una de las cuales consiste de un dominio amino terminal extracelular, un dominio de unión al ligando extracelular y dominio carboxilo terminal intracelular (Kubo e Ito, 2004). Los iGluR se subdividen en tres familias: los que responden a α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA), los sensibles a 2-carboxil-3-carboximetil-4-isopropenilpirrolidina (kainato, KA), y los activados por N-metil-D-aspartato (NMDA) (Michaelis, 1998; Maden, 2002).

Receptores de AMPA

Los receptores de AMPA (AMPA) median la neurotransmisión excitadora rápida en el SNC. Se conocen cuatro familias de subunidades (GluR1-GluR4) que son producto de genes separados; el ensamble de dichas subunidades forman canales permeables principalmente al Na^+ y al K^+ , y en algunos casos al Ca^{2+} , dependiendo de la composición de las mismas. La diversidad de las subunidades se debe al procesamiento por edición y empalme alternativo del RNA de las subunidades. El empalme alternativo en una región exónica de 38 aminoácidos del dominio extracelular S2 en todas las subunidades da origen a dos isoformas conocidas como Flip y Flop. Las variantes Flip se desensibilizan más lentamente que las Flop y se expresan principalmente en etapas prenatales, mientras que las Flop se expresan en etapas postnatales. Estas isoformas afectan la cinética de desensibilización del receptor (Kew y Kemp, 2005).

La subunidad GluR2 tiene un papel clave en la modulación de la permeabilidad del receptor al Ca^{2+} , de manera que los AMPAR que no contienen GluR2 son permeables al Ca^{2+} . La impermeabilidad al Ca^{2+} en los AMPAR que contienen GluR2 se debe a la presencia de una arginina (R) en lugar de una glutamina (Q) en el sitio Q/R del dominio M2, debido al procesamiento por edición post-transcripcional (Dingledine, et al, 1999). De esta manera, la mayoría de las subunidades GluR2 en adultos está editada para originar una arginina, por lo que previene la entrada de Ca^{2+} (Kew y Kemp, 2005).

Además, las subunidades GluR2, GluR3 y GluR4 se editan en el sitio R/G, en la región extracelular en el dominio S2, en donde una glicina (G) en lugar de una arginina (R) reduce el tiempo de la desensibilización del receptor (Dingledine, et al., 1999; Kew y Kemp, 2005).

Adicionalmente, las subunidades GluR2 y GluR4 tienen variantes por empalme alternativo que originan regiones intracelulares cortas o largas del C-terminal que podrían ser importantes en la interacción proteína-proteína (Dingledine et al. 1999).

En cuanto a la farmacología, los AMPAR responden, además del AMPA, al kainato, al ibotenato, al quisqualato y a la walardina. El glutamato y el AMPA actúan como agonistas totales induciendo rápidamente la desensibilización,

mientras que el kainato actúa como un agonista parcial de los AMPAR. Se conocen varios compuestos que actúan como antagonistas de los AMPAR, entre ellos algunas quinoxalinas (PNQX, YM-90K, YM872, ZK200775) que reconocen tanto a los receptores de AMPA como a los de kainato. Algunos derivados de quinazolinonas actúan como antagonistas no competitivos de los AMPAR (CP-465,022; Kew y Kemp, 2005). Asimismo, algunas benzotiazidas y benzamidas funcionan como moduladores alostéricos positivos en las isoformas Flip y Flop del receptor (Kew y Kemp, 2005).

Las subunidades GluR1, GluR2 y GluR3 se expresan en todo el sistema nervioso central de vertebrados, mientras que la GluR4 tiene una expresión predominante en la corteza del cerebelo, las células granulares del giro dentado, el área CA1 del hipocampo y el bulbo olfatorio (Romano et al, 1998; Kew y Kemp, 2005). Las células del EPR también contienen AMPAR (López-colomé et al., 1993; 1994), pero las subunidades que los conforman no se han caracterizado.

Receptores de Kainato

Los receptores de kainato son canales tetraméricos formados por dos familias de subunidades relacionadas, GluR5-GluR7 y KA1 y KA2. Las subunidades KA1 y KA2 no forman receptores homoméricos funcionales, a menos que se ensamblen con las subunidades GluR5-GluR7. La heterogeneidad de estos receptores, igual que los de AMPA, depende de los procesos de edición (sitios R/G y Q/R) y empalme alternativo en las subunidades GluR5-GluR7 (Kew y Kemp, 2005).

Estos receptores tienen una alta afinidad por el ácido kaínico y el ácido demoico, una menor afinidad por el glutamato y mucho menor por el AMPA. Se conocen agonistas selectivos para los receptores de KA que contienen a la subunidad GluR5 (ATPA, LY382884, UBP296, NS3763). Existen también moduladores alostéricos positivos para los receptores de kainato como la lectina concavalina A, que inhibe la desensibilización mediante la interacción con residuos N-glicosilados, además incrementa la afinidad del agonista por el receptor, pero su efecto no es específico ya que actúa también en los receptores de AMPA y NMDA (Kew y Kemp, 2005).

Las quinoxalinas 6-ciano-7nitro-quinoxalina-2,3-diona (CNQX), 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX) y 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfaoil-benzo(F)quinoxalina (NBQX) son antagonistas de los receptores de AMPA y KA, bloquean competitivamente a ambos tipos de receptores. Sin embargo, la CNQX y la DNQX también inhiben a los receptores de NMDA de manera no competitiva ya que interaccionan con el sitio de reconocimiento a la glicina en este receptor (Michaelis, 1998, Pellegrini-Giampietro, 1989).

Dado que los receptores de AMPA y KA tienen características farmacológicas similares, se han desarrollado fármacos para discriminar entre ambos subtipos de receptores (Lerma, 2006). La 1(4-aminofenil)-3-metilcarbamil-4-metil-7,8-metilenodioxi,3,4-dihidro5H-2,3-benzodiazepina (GYKI 53655) y la (\pm)4-(4-aminofenil)-1,2-dihidro-1-metil-z-propilcarbamoil-6,7-metilenodioxi-fitalazina (SYM2206) inhiben selectivamente a los AMPAR sin alterar la actividad de los receptores de KA (Rodríguez-Moreno y Sihra, 2007).

La localización de los receptores de kainato es principalmente en las terminales pre-sinápticas de interneuronas del hipocampo, la amígdala lateral, las células bipolares de la retina, la corteza cerebral, el globo pálido y el cerebelo (Huettner, 2003), así como en EPR (López-colomé et al., 1993; 1994).

Receptores de NMDA

Los receptores de NMDA (NMDAR), a diferencia de los de AMPA y de Kainato, responden lentamente al glutamato y su contribución es principalmente al componente lento de corrientes post-sinápticas excitadoras (Michaelis, 1998), por lo que la activación rápida de los receptores AMPA/KA es lo que lleva a la despolarización de la membrana post-sináptica y la activación de los receptores de NMDA.

Los NMDAR son canales altamente permeables al Ca^{2+} . En condiciones fisiológicas, el canal del receptor está bloqueado por Mg^{2+} ; este bloqueo es dependiente del voltaje: se inhibe el flujo de la corriente por el canal a potenciales cercanos al reposo y se suprime cuando se despolariza la membrana. El canal está formado por las subunidades NR1 y NR2, y en algunos casos NR3 (Cull-Candy et al, 2001; Madden, 2002) que se ensamblan

para generar receptores con propiedades farmacológicas y electrofisiológicas diferentes dependiendo de la combinación de las subunidades.

La caracterización de las subunidades que forman el receptor ha hecho posible conocer algunos mecanismos moleculares de su regulación funcional. Se conocen ocho variantes de la subunidad NR1 (NR1a-h) generadas por corte y empalme alternativo de un gene, cuatro diferentes subunidades NR2 (A-D) codificadas por cuatro genes diferentes, y dos subunidades NR3 (A y B) (Paoletti y Neyton, 2007; Cull-Candy et al, 2001). La presencia de una subunidad NR3 en el receptor reduce notablemente la permeabilidad del Ca^{2+} y el bloqueo por el Mg^{2+} (Matsuda et al., 2002; Sasaki et al., 2002). Asimismo, el ensamble de las subunidades NR1 con NR3 forma receptores excitadores que se activan solamente con glicina (Chatterton et al, 2002). Los canales que tienen NR2A o NR2B son más sensibles al bloqueo por Mg^{2+} que los canales que contienen NR2C o NR2D (Liu y Zhang, 2000; Romano et al, 1998).

Además del sitio de reconocimiento para el glu en la subunidad NR2, el receptor posee un sitio de modulación negativo para el Zn^{2+} y algunas poliaminas, como la espermina y espermidina, que gracias a su carga positiva aumentan la afinidad del receptor por la glicina (Kew y Kemp, 2005). La glicina y/o la D-serina actúan como co-agonistas en un sitio alostérico positivo ubicado en la subunidades NR1 y NR3 (Yao y Mayer, 2006; Paoletti y Neyton, 2007).

Hay cuatro categorías de los antagonistas para los receptores NMDA: los fosfonoaminoácidos que compiten por los sitios de reconocimiento del L-Glu y/o el NMDA (2-AP5, 2-AP7, CPP, CPP-eno), los que bloquean los sitios de unión para el co-agonista glicina (ácido 5,7-dicloro-kinurenato, HA-966), los que inhiben el aumento alostérico de la activación del agonista por las poliaminas (ifenprodil), y los no competitivos, que bloquean el canal iónico (MK-801, PCP, ketamina, fenciclidina, memantina) (Kew y Kemp, 2005; Nankai et al., 1998).

Los NMDAR se distribuyen diferencialmente en el SNC y tienen diferentes patrones de expresión durante el desarrollo dependiendo de la composición de las subunidades. Dado que al menos una subunidad NR1 es necesaria para que se forme el canal (Monyer et al, 1992), la distribución de esta subunidad es homogénea (Michaelis, 1998). Los receptores con NR2A se expresan en la corteza cerebral y cerebelar, el hipocampo y el bulbo olfatorio. Los que contienen NR2B se expresan predominantemente en el telencéfalo, y en menor

medida en el diencéfalo y el tallo cerebral; la subunidades NR2C se localizan principalmente en las células granulares del cerebelo, y las NR2D se expresan en el diencéfalo y el tallo cerebral, principalmente (Michaelis, 1998). Los receptores que contienen a la subunidad NR3a se distribuyen de manera generalizada en el SNC, mientras que los que contienen NR3b se expresan en motoneuronas (Das et al, 1998). En el EPR también se han detectado NMDAR (López-colomé et al., 1993; 1994), pero se desconoce la composición de las subunidades que los conforman.

Receptores metabotrópicos

Los receptores metabotrópicos (mGluR) se subdividen en tres grupos con base en la analogía de su secuencia de aminoácidos, en sus propiedades farmacológicas y en su mecanismo de transducción de señales. La mayoría de genes que codifican para los mGluR generan variantes por corte y empalme alternativo que difieren en su dominio carboxilo terminal, siendo mucho más grande el dominio de los mGlu1a, mGlu5a y mGlu5b que las otras variantes (Fagni et al., 2004). Los mGluR poseen siete dominios transmembranales y un sitio de unión del glutamato ubicado en el N-terminal extracelular (Conn y Pinn, 1997).

Los mGluR del grupo I (mGlu1 y mGlu5) son receptores acoplados a la proteína $G\alpha_q$, la cual estimula a la fosfolipasa C (PLC) para generar diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3 ; Conn y Pin, 1997). El DAG estimula la actividad de la PKC mediante un notable aumento de la afinidad de la enzima por el Ca^{2+} , mientras que el IP_3 induce la liberación de Ca^{2+} a través de su interacción con receptores específicos del retículo endoplásmico (Michaelis, 1998). Para este grupo, el quisqualato es el agonista más potente, seguido por el glutamato, ibotenato y ácido 1-aminociclopentano dicarboxílico ($1_S,3_R$ -ACPD). La expresión de este tipo de receptores ocurre principalmente en sitios post-sinápticos (Kim et al, 2008)

Los del grupo II de mGluR (mGlu2 y mGlu3) son receptores acoplados a proteínas $G\alpha_{i/o}$, que inhiben la formación de AMPc. El agonista específico para este grupo es el 2R, 4R-APCD. Se localizan tanto en sitios pre como en post-sinápticos (kim et al, 2008).

El grupo III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 y mGlu8) está constituido por receptores acoplados a proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$, que inhiben la formación de AMPc mediante la interacción directa con proteínas G sensibles a la toxina pertussis (PTX; Michaelis, 1998). Los agonistas más eficientes son el 1_S , 3_R -ACPD, el L-CCG, el quisqualato y, en algunas neuronas, el 2-AP4. Este grupo de receptores se expresan principalmente en sitios pre-sinápticos, con excepción del mGlu6 que se expresa únicamente en la retina (Fagni, 2004; kim et al, 2008). En el EPR se expresan mGluR del grupo I, los cuales llevan a la formación de fosfoinosítidos (Fragoso y López-Colomé, 1999) y la subsecuente activación de vías de señalamiento intracelular.

Uno de los mecanismos de señalamiento intracelular mediado por la estimulación tanto de los iGluR como de los mGluR, es la activación de las vías de MAP cinasas, a continuación descrita.

MAP cinasas

Entre los mecanismos generales de señalamiento intracelular en las células eucariontes están los promovidos por las cinasas de proteína activadas por mitógeno (MAPK). Todas las células poseen múltiples vías de MAPK para responder coordinadamente a diversos estímulos, entre ellos hormonas, factores de crecimiento, citocinas y estrés ambiental (Krishna y Narang, 2008). Las MAPK controlan diversas funciones celulares como la proliferación, la migración, el metabolismo, la sobrevivencia, la apoptosis y la diferenciación celular. Se han descrito seis familias de MAPK en mamíferos: las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2), las cinasas de la porción amino terminal de c-jun (JNKs 1, 2 y 3), las p38 (α , β , γ , δ), las ERK7/8, las ERK3/4 y la ERK5. De éstas, las más estudiadas son ERK1/2, JNK y p38 (Roux y Blenis, 2004; Krishna y Narang, 2008).

Las MAPK constituyen un módulo de tres cinasas evolutivamente conservadas, que se activan secuencialmente: una MAPK cinasa cinasa (MAPKKK), una MAPK cinasa (MAPKK) y una MAPK (figura V). Las MAPKKK son cinasas de serina/treonina que se activan por fosforilación o por su interacción con una GTPasa como Ras o Rho. La activación de las MAPKKK lleva a la fosforilación

y activación de las MAPKK, las cuales se activan por fosforilación de serina o treonina; son enzimas con especificidad dual para su sustrato ya que activan por fosforilación a las MAPK en residuos de treonina y tirosina en el motivo Thr-X-Tyr. Una MAPK se activa una vez que se fosforilan ambos residuos (Thr/Tyr), mientras que una MAPKK puede iniciar su activación con la fosforilación de un solo sitio (Pearson, et al., 2001).

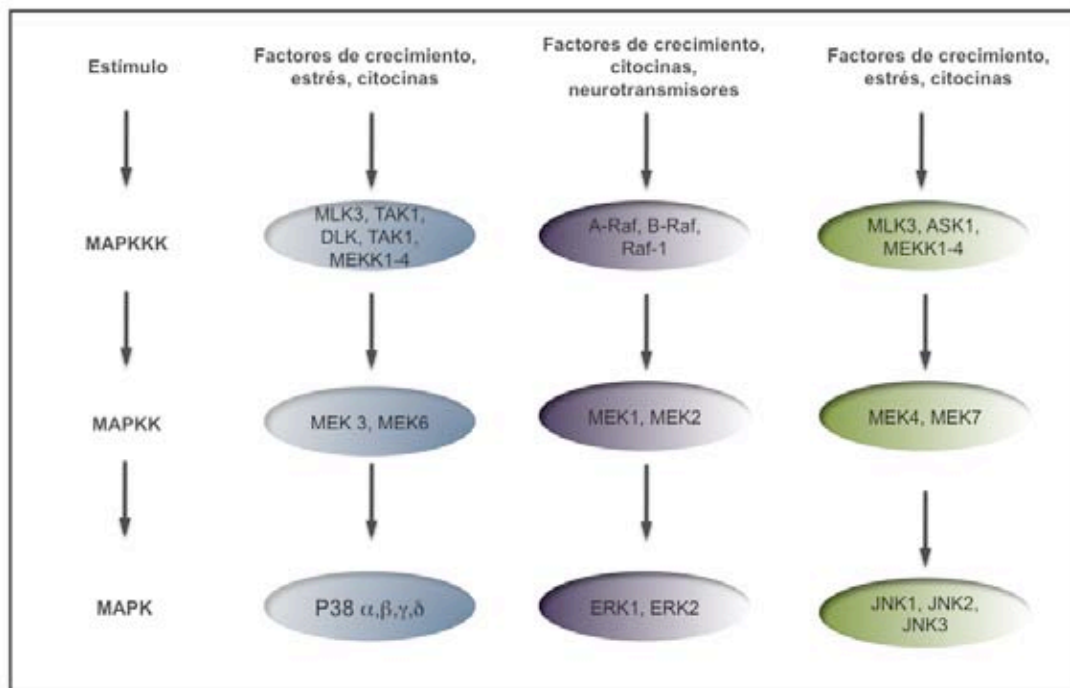


Figura V. Diagrama simplificado de las vías principales de MAP cinasas. Cada módulo consta de tres cinasas que se activan en cascada (Krishna y Narag, 2008).

Descripción de la vía de ERK1/2

La vía de señalamiento de ERK 1/2, también conocida como la cascada clásica de MAP cinasas, incluye a las MAPKKK A-Raf, B-Raf y Raf-1, a las MAPKK MEK1 y MEK2, y a las MAPK ERK1 y ERK2. El mecanismo de activación mejor descrito de la cascada Raf/MEK/ERK es a través de la activación de receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK) (Roux y Blenis, 2004; figura VI).

La GTPasa Ras es el vínculo entre los RTK y la activación de Raf/MEK/ERK. Ras está unida a la membrana y su activación requiere de factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) para acelerar la tasa de disociación de GDP (Mor y Philips, 2005; McKay y Morrison, 2007). La localización de Ras en la cara interna de la membrana plasmática es un requisito indispensable para su actividad biológica. Ras se sintetiza en el citoplasma como proteína soluble, y requiere de una serie de modificaciones postraduccionales que incluye la isoprenilación, proteólisis y metilación, así como la adición de dos residuos palmitoilo al extremo C-terminal CAAX de algunas isoformas de Ras (N-Ras y H-Ras) para su transporte y anclaje a la membrana (Mor y Philips, 2005).

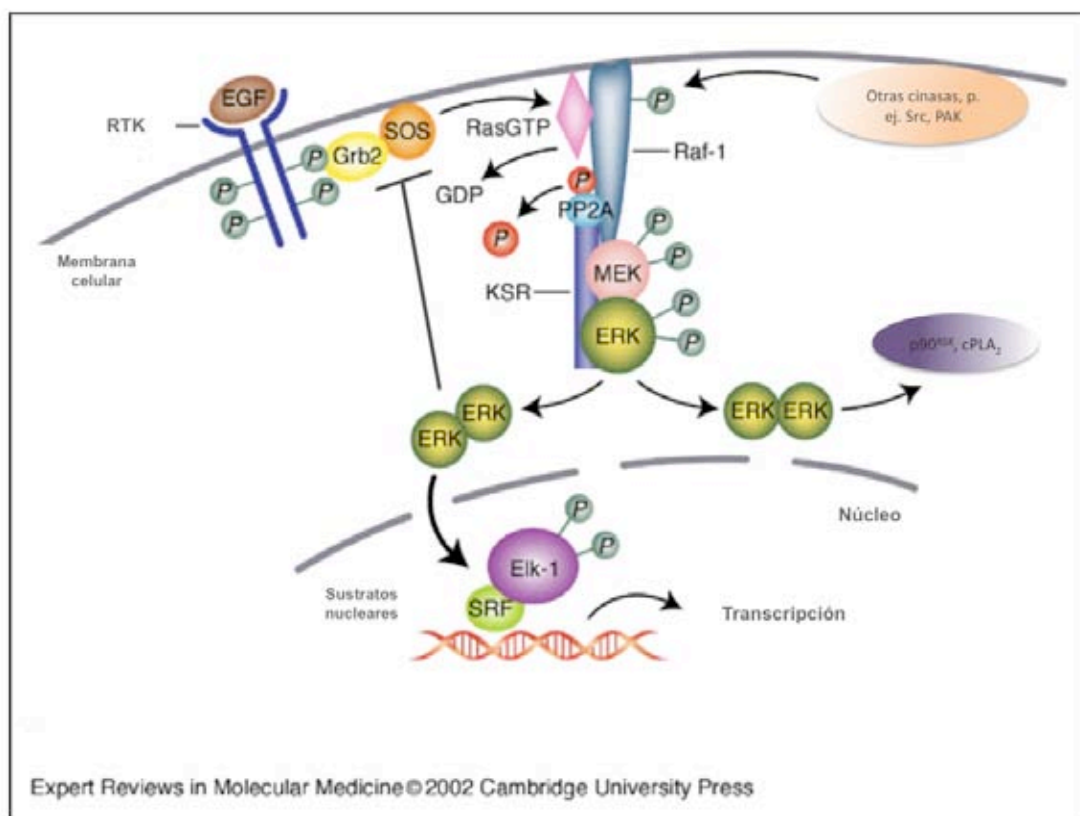


Figura VI. Mecnismo clásico de activación de la vía de ERK 1/2. La activación de los receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK) inducen el reclutamiento de proteínas adaptadoras que promueven la activación de la GTPasa Ras, la cual activa la cascada Raf/MEK/ERK. Imagen modificada de http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM4_08/S1462399402004386sup013.gif

Al activarse los receptores de fosforilación en tirosina, reclutan a la membrana a moléculas de señalamiento o de anclaje que contienen dominios SH2 o PTB, entre las que se encuentran Grb2, unida constitutivamente a SOS a través de su dominio SH3. SOS es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) que promueve el intercambio de GDP por GTP en Ras. Consecuentemente, la activación de los receptores induce la translocación de SOS a la membrana y su colocalización con Ras. Una vez activada en la membrana, Ras recluta a la cinasa de serina/treonina Raf, para su activación por otras cinasas (Morrison y Cutler, 1997).

Las Raf son cinasas de proteína que fosforilan en residuos de serina/treonina. Se conocen tres isoformas, A-Raf, B-Raf y C-Raf (Raf-1). Tienen en común tres regiones conservadas, CR1, CR2 y CR3. CR1 contiene el dominio de unión a Ras (RBD) y un dominio adyacente rico en cisteína (CRD), ambos esenciales para su interacción con Ras (Dhillon y Kolch, 2002; Kolch, 2000). Mientras que la región CR2 contiene una secuencia rica en Ser/Thr, en la región CR3 se localiza el dominio catalítico de Raf (Chong et al, 2003). Ras puede activar, directa o indirectamente, a todas las isoformas de Raf (Chong et al, 2003).

Raf-1, la isoforma mejor conocida, se activa mediante varios eventos. La proteína reguladora 14-3-3 se une a las serinas 259 y 621 fosforiladas de Raf-1 lo que inactiva a la cinasa. La activación de Raf-1 ocurre en la membrana una vez que Ras desplaza a la 14-3-3 para permitir que las fosfatasas PP1 y PP2A desfosforilen a las Ser259 y Ser62 (Jaumot y Hancock, 2001). Posteriormente, la fosforilación de la Ser338 y la Tyr341 activan a Raf-1 sinérgicamente (Kolch, 2000). Las cinasas de Ser/Thr PAK, activadas por la PI3K, pueden fosforilar la Ser338 de Raf-1 (Chaudhary et al, 2000; King et al, 1998). Además de la activación por Ras, se ha reportado la cooperación de otras GTPasas, como Rho, en la activación de Raf (Li et al, 2001).

A pesar de que la secuencia primaria de las cinasas Raf está muy conservada, las isoformas tienen algunas propiedades funcionales diferentes. Por ejemplo, A-Raf activa solamente a MEK1, mientras que Raf-1 activa tanto a MEK1 como a MEK2 (Chong et al, 2003). A diferencia de Raf-1, B-Raf se activa directamente por la unión de Ras. Además, B-Raf tiene mayor especificidad por MEK que Raf-1 (O'Neill y Kolch, 2004).

Las MEK son las únicas cinasas con actividad dual, ya que fosforilan tanto a residuos de Ser/Thr como de Tyr. Se conocen tres isoformas de esta enzima: MEK1, MEK1b y MEK2. La activación de MEK1 se lleva a cabo por fosforilación de los residuos Ser218 y Ser222 (Yoon y Seger, 2006; Shaul y Seger, 2007). La activación de MEK por Raf como consecuencia de la estimulación mitogénica requiere su localización en la membrana (O'Neill y Kolch, 2004). MEK está unida constitutivamente a la cinasa supresora de Raf, KSR, y al dímero de la proteína 14-3-3 que se une a la Ser392 de KSR, fosforilada por la cinasa C-TAK1 (Cdc25C-associated kinase 1). En respuesta a estímulos, tales como los factores de crecimiento, la fosforilación de la Ser392 de KSR tiene como consecuencia la disociación de la proteína 14-3-3, así como la exposición del dominio C1 de KSR y la secuencia FxFP, reconocida por las MAPK. Este cambio de configuración induce la translocación del complejo KSR a la membrana, y la colocalización de MEK tanto con su activador, Raf, como con su sustrato, ERK1/2 (Müller et al, 2001)

Los únicos sustratos fisiológicos conocidos de MEK1/2 son ERK1 y ERK2 (Yoon y Seger, 2006). MEK activa a ERK1 y a ERK2 mediante la fosforilación de los residuos de Tyr 204 y Thr 202, y de Tyr 185 y Thr 183, respectivamente (Shaul y Seger, 2007; Yoon y Seger, 2006). A su vez, las cinasas ERK 1/2 activan a una amplia gama de sustratos tanto membranales como citoplásmicos, por fosforilación de residuos de Ser/Thr (Roux y Blenis, 2004).

En contraste con su interacción en vías de señalamiento activadoras, más recientemente se ha documentado la función de ERK en procesos de retroalimentación negativa, tanto en la inactivación de Ras, mediante la promoción de la disociación de SOS y Grb2 (Kolch et al., 2005), como en la regulación de la activación de MEK 1 por fosforilación de la Ser386 (Shaul y Seger, 2007).

Sustratos de ERK 1/2

Una vez activadas, las MAPK fosforilan a un gran número de sustratos en residuos de serina o de treonina localizados en diferentes compartimentos celulares (Rubinfeld y Seger, 2005). Entre los sustratos nucleares de ERK1/2 están SRC-1, Pax6, NFAT, Elk-1, MEF-2, c-fos, c-jun, c-myc, STAT3 y CREB

(Pearson, et al., 2001). Las proteínas del citoesqueleto que fosforila ERK1/2 son la paxilina y a las subunidades de los neurofilamentos (Chen et al., 2001). Algunos de los principales sustratos citoplásmicos de ERK1/2 son la fosfolipasa citoplásmica cPLA₂, CD120a, Syk y calnexina (Yoon y Seger, 2006), así como a otras cinasas activadas por MAPK (MK). La familia de las MK incluye a las cinasas de la subunidad ribosomal S6 de 90 kDa, p90^{RSK} (RSK1-4), a las cinasas activadas por mitógenos y por estrés (MSK1 y 2), a las cinasas de interacción con MAPK (MNK1 y 2), a las cinasas de proteína activadas por MAPK 2 y 3 (MK2 y MK3 ó MAPKAP-K2 y MAPKAP-K3), y a las cinasas de proteína activadas por MAPK 5 (MK5 o MAPKAP-5) (Krishna y Narag, 2008). De esta familia de MK, las RSK son sustratos exclusivos de ERK 1/2 (Roux y Blenis, 2004). Cuando una RSK se activa, se transloca al núcleo y fosforila a varios sustratos, de los cuales muchos son también sustratos de ERK 1/2 y de las MSK, tales como los factores de transcripción CREB, Elk-1 y c-Fos, así como coactivadores como SRF y CBP (Frödin y Gammeltoft, 1999; Yang, et al., 1998).

Activación del factor de transcripción CREB

La proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) es un factor de transcripción que pertenece a la familia de proteínas con cremalleras básicas de leucina (bZIP). Inicialmente, se pensó que CREB mediaba únicamente respuestas a estímulos que elevan la concentración de AMPc; sin embargo, se ha demostrado que una amplia gama de estímulos inducen la fosforilación de CREB en la Ser133, entre ellos factores de crecimiento, neurotransmisores y estrés (Ginty et al., 1994). La activación de CREB induce la transcripción de más de 5000 genes, incluyendo proto-oncogenes, reguladores del ciclo celular como las ciclinas A1 y D2, y genes relacionados con la sobrevivencia y la diferenciación celular (Siu y Jin, 2007; figura VII). Asimismo, CREB juega un papel importante en el sistema nervioso central en eventos de plasticidad sináptica como la memoria y el aprendizaje (Silva et al., 1998).

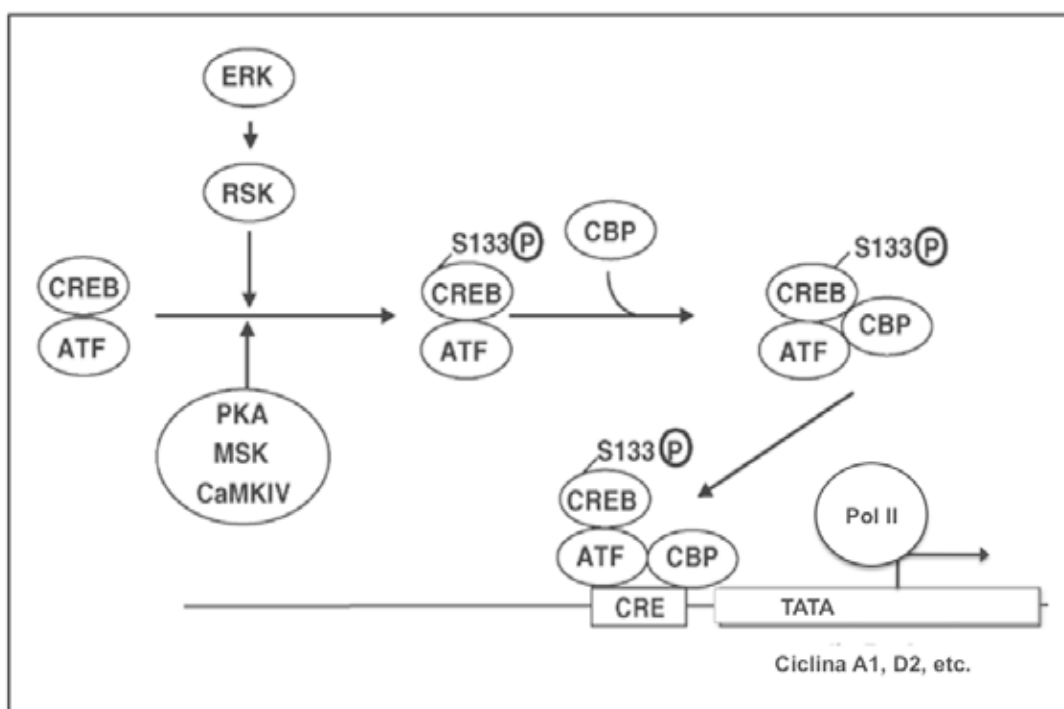


Figura VII. Activación de CREB. La fosforilación de la Ser133 es un requisito para la unión del coactivador CBP a CREB, para reclutar a la Pol II en la caja TATA, e inducir la transcripción (ver texto). Figura modificada de <http://www.nature.com/leu/journal/v17/n7/images/2402945f11.gif>.

La fosforilación de la Ser133 es un requisito para la transcripción de genes inducida por CREB. Sin embargo, la actividad y la especificidad se modulan por la fosforilación de sitios adicionales de CREB o de las proteínas que se asocian a este factor de transcripción (Shaywitz y Greenberg, 1999). CREB se une a su secuencia blanco en el DNA como un dímero. La dimerización se lleva a cabo mediante un dominio estructural conservado que consta de una repetición de siete residuos de leucina (cremallera de leucina o bZIP). La unión al DNA está mediada por una región rica en residuos de lisina y arginina cercano a la cremallera de leucina en el N-terminal (Shaywitz y Greenberg, 1999). Entre los factores de transcripción que contienen bZIP, CREB, ATF1 (factor de transcripción activador) y CREM (elemento modulador de respuesta al AMPc) constituyen un grupo de proteínas que comparten un alto grado de identidad en la región bZIP, lo cual sugiere que los diferentes miembros de

CREB/ATF1/CREM podrían formar heterodímeros (Shaywitz y Greenberg, 1999).

La Ser133 de CREB se localiza en una región llamada dominio de cinasa inducible (KID), que abarca múltiples sitios de fosforilación para varias cinasas. La proteína de unión a CREB (CBP) es una proteína nuclear que se asocia con la Ser133 fosforilada (p-Ser133) de CREB (además de unirse con muchos otros factores de transcripción) mediante una región en el N-terminal de CBP conocida como dominio de interacción con KID (KIX), esta unión es muy importante para la actividad de CREB (figura VII). CBP es homóloga de la proteína p300, la cual cumple una función similar a CBP, pero a diferencia de ésta, la asociación de p300 con la p-Ser133 no se requiere para la actividad de CREB en todos los tipos celulares (Yao et al., 1996). La CBP sirve como un puente molecular que le permite a CREB reclutar y estabilizar el complejo transcripcional de la RNA polimerasa II (Pol II) en la caja TATA. Funciona como un adaptador transcripcional que une a la p-Ser133 a la maquinaria de transcripción. El reclutamiento de la Pol II con el complejo CREB/CBP requiere que el dominio KID esté fosforilado, y se ha sugerido que la fosforilación de la Ser133 es necesaria para reclutar a la Pol II (Nakajima et al., 1997). Además de la CBP, p-CREB utiliza como puente para interactuar con la Pol II a la RNA helicasa A (RHA) (Shaywitz y Greenberg, 1999).

Dado que los factores de crecimiento también inducen la activación de CREB, se ha descrito que este factor de transcripción, de manera dependiente de la fosforilación de la Ser133, juega un papel crítico en mediar la inducción de la transcripción del gene c-fos en respuesta a factores de crecimiento (Bonni et al., 1995). Para activar la transcripción de c-fos, CREB coopera con un factor de transcripción complejo compuesto por Elk1 y el factor de respuesta al suero (SRF) que se unen al elemento de respuesta al suero (SRE) en el promotor de c-fos (Xing et al., 1996). En neuronas corticales primarias, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), mediante el aumento del Ca^{2+} intracelular, activa vías de señalamiento que inducen la fosforilación de la Ser133 y la transcripción dependiente de CREB (Finkbeiner et al., 1997).

En el sistema nervioso, la despolarización de la membrana permite la entrada de Ca^{2+} extracelular mediante diferentes mecanismos. Por ejemplo, la

activación de los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje (VSCC), la activación de los receptores de glutamato del tipo NMDA; o bien, la activación de receptores acoplados a proteínas G que conducen al aumento del Ca^{2+} intracelular proveniente del retículo endoplásmico. Se ha demostrado que este flujo de Ca^{2+} activa a CREB induciendo la fosforilación de la Ser133, así como su interacción con la CBP mediante los dominios KID y KIX (Shaywitz y Greenberg, 1999). Asimismo, el aumento de Ca^{2+} intracelular activa la transcripción de *c-fos* a través del elemento de respuesta al Ca^{2+} (CaRE) (Greenberg et al., 1986), cuyo factor de unión es CREB (Sheng et al., 1990).

Cinasas que activan a CREB

Existen varias cinasas que fosforilan a CREB, algunas de las cuales responden al aumento del Ca^{2+} intracelular. Entre éstas están las cinasas dependientes de Ca^{2+} /Calmodulina I, II y IV (CaMKI, II y IV), las RSK1, 2 y 3, la PKC y la PKA (Shaywitz y Greenberg, 1999). Las cinasas mejor caracterizadas que responden al Ca^{2+} y que activan a CREB son las cinasas dependientes de Ca^{2+} /CaM (CaMK). El aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular promueve la unión de la calmodulina (CaM) al Ca^{2+} . El complejo Ca^{2+} /CaM activa directamente a la CaMKII, o mediante la activación de una cinasa de la CaMK (CaMKK) a las CaMKI y CaMKIV (Soderling, 1999). La secuencia que contiene a la Ser133 corresponde al sitio consenso para la fosforilación por las CaMK (RXXS). Aunque se ha reportado que *in vitro* las CaMKI, II y IV fosforilan la Ser133, cada vez hay mayor evidencia de que la familia de las CaMKIV son las que activan a CREB en respuesta a la entrada de Ca^{2+} . Lo anterior se justifica porque la cinética de activación de la CaMKIV corresponde con la fosforilación de la Ser133 de CREB (Bito et al., 1996) y la localización de la CaMKIV es nuclear, igual que CREB (Hardingham et al., 1997). Adicionalmente, se sabe que la CaMKII fosforila a CREB en un segundo sitio, la Ser142, situada en el dominio KID. Sin embargo, su función es inhibir la actividad de CREB, ya que evita la interacción de la CBP con CREB (Wu y McMurray, 2001).

Las cinasas de la familia RSK, substratos de ERK1/2, una vez activadas se translocan al núcleo y fosforilan a CREB en la Ser133. Entre otros

coactivadores, las RSK fosforilan a CBP y a P300. Adicionalmente, las cinasas activadas por mitógenos y por estrés MSK1 y 2 también fosforilan a CREB en el mismo sitio (Frödin y Gammeltoft, 1999).

Activación de la cascada Ras/Raf/MEK/ERK por otras cinasas

La vía de ERK 1/2 puede ser activada por otras vías de señalamiento, como las PKC, las CaMK y las PI3K. Varios reportes indican que todas las isoformas de las PKC activan la cascada Ras/Raf/MEK/ERK: las convencionales y las nuevas activan la vía a partir de Raf, mientras que las atípicas lo hacen por la activación directa de MEK 1/2, independiente de Raf (Schönwasser, et al., 1998). Existe evidencia tanto de la fosforilación directa de Raf por isoformas de la PKC (Kolch et al., 1993) como su activación indirecta.

La PKC α activa a Raf-1 directamente por fosforilación en la Ser499 (Kolch et al., 1993). Esta isoforma también activa a MEK 1/2 de manera independiente de Raf (Wen-Sheng, 2006), sin embargo el mecanismo de activación se desconoce. La PKC ϵ fosforila a Raf-1 (Cheng et al., 2001; Lee et al., 2003) en residuos de serina (Cai, et al., 1997). La PKC δ activa a Raf, independientemente de Ras (Ueda, et al., 1996).

La activación de la vía de ERK 1/2 por la PKC ζ independiente de Ras, depende de la PI3K (Takeda et al., 1999), mediada por la actividad de la PDK-1 (Le Good et al., 1998). Se ha propuesto que la PKC ζ se activa por fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP₃) (Nakanishi et al., 1992), sin embargo, estos fosfatos de inositol, producto de la PI3-K, no son suficientes para activarla, sino que la reclutan en la membrana para que la PKD-1 la active (Le Good, et al., 1998). Esta activación de la PKC ζ lleva a la activación de MEK 1/2 (Takeda, et al., 1999), sin embargo, la fosforilación directa de MEK por la PKC ζ no se ha demostrado.

La activación de las cinasas dependientes de Ca²⁺/CaM también puede activar la vía de ERK 1/2. Aunque se sabe poco al respecto, se ha demostrado que la activación de la CaMKI por la CaMKK media la activación de ERK 1/2 a través de Ras (Schmitt et al., 2004), mientras que la CaMKII lo hace mediante la activación directa de Raf (Illario et al., 2003). La activación indirecta de la vía de ERK 1/2 por la CaMKII puede llevarse a cabo a través de proteínas

activadas por Ca^{2+} , como las cinasas de tirosina Pyk2 y Src (Keely et al., 2000; Ginnan y Singer, 2002), que activan la vía mediante la transactivación de receptores con actividad de cinasa de tirosina (Shah y Catt, 2002).

La cascada de Raf/MEK/ERK puede ser activada, además de Ras, por otras GTPasas, como Rac, que pertenece a la familia de Rho. Rac a través de la cinasa de Ser/Thr PAK1, activa a Raf-1 por fosforilación en la Ser338 (Chaudhary et al, 2000; Symons, 2000). Recientemente se describió que PAK1 fosforila a MEK1 en la Ser298 (Slack-Davis et al, 2003) para promover su autofosforilación en el loop de activación (Ser218/Ser222) (Park et al, 2007).

Activación de la vía de ERK 1/2 por receptores de glutamato

La vía de ERK 1/2 participa en la proliferación y migración de neuronas durante el desarrollo del SNC. Sin embargo, en neuronas maduras esta vía está juega un papel muy importante en la plasticidad sináptica (Thomas y Huganir, 2004). ERK1 y ERK2 se expresan de manera abundante en el SNC y se activan en respuesta al señalamiento por glutamato durante procesos fisiológicos normales y patológicos. La activación de ERK 1/2 en respuesta a la despolarización de la membrana o al señalamiento por glutamato procede por una vía diferente de la clásica, descrita anteriormente. Estos estímulos, propios de neuronas, activan a ERK 1/2 mediante el flujo de Ca^{2+} , el cual entra por la activación de los NMDAR o por canales de Ca^{2+} activados por voltaje (Thomas y Huganir, 2004).

Varios estudios han documentado la fosforilación rápida y transitoria de ERK 1/2, en respuesta a la activación de los NMDAR, la cual está controlada por STEP, una fosfatasa de tirosina que depende de la calcineurina para su desfosforilación/activación. Al parecer, STEP inicia la desfosforilación de ERK y posteriormente actúan la fosfatasas PP2A y MKP3 (Zhou et al., 2002). Uno de los principales mecanismos de activación de ERK 1/2 está mediado por las CaMK, por ser las principales cinasas sensibles al Ca^{2+} (Soderling y Stull, 2001). La cinasa fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) también contribuye a la activación de ERK 1/2 inducida por NMDA (Wang et al., 2007; Takeda et al., 1999), pero su mecanismo de acción no se conoce.

En algunos subtipos de neuronas, el flujo de Ca^{2+} activa a las adenilil ciclasas sensibles al Ca^{2+} , promoviendo la formación de AMPc y la subsecuente activación de la cinasa de proteína A (PKA), la cual puede entrar al núcleo y fosforilar a CREB en la Ser133 (Chawla et al., 1998). Sin embargo, en el EPR esta vía inhibe a ERK y evita la proliferación (Hecquet et al., 2002).

El aumento de Ca^{2+} también puede activar a la GTPasa Ras mediante diferentes mecanismos, entre los cuales están las cinasas de tirosina que se activan por Ca^{2+} , Pyk2 y Src. Estas cinasas fosforilan a la proteína adaptadora Shc, la cual conduce a la activación de Ras (Takai et al., 2001). Otro mecanismo esta mediado por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) p140 Ras-GRF1 y p130 Ras-GRF2. Estos GEF contienen dominios de unión a calmodulina, por lo que activan a Ras en respuesta al aumento de Ca^{2+} (Thomas y Huganir, 2004). Asimismo, la despolarización de la membrana induce la fosforilación del receptor EGF de manera independiente del ligando. Este mecanismo indirecto, induce al complejo Shc/Grb2/Sos a activar a Ras en la membrana (Rosen y Greenberg, 1996), cuya cascada de activación (Ras/ERK) se requiere para mantener la fosforilación de la Ser133 de CREB (Shaywitz y Greenberg, 1999).

Los receptores de AMPA también activan la vía de ERK 1/2. Las principales cinasas que intervienen en el señalamiento por estos receptores son la CaMKII y la PI3K (Perkinton et al., 1999; Agell et al., 2002). El mecanismo de activación de esta vía se lleva a cabo por AMPAR que son permeables a Ca^{2+} , o bien, mediante la activación de canales de Ca^{2+} activados por voltaje (Tian y Feig, 2006).

Los mGluR del grupo I activan a ERK 1/2 mediante dos mecanismos diferentes, uno de ellos involucra al Ca^{2+} y está mediado por la $\text{PLC}\beta$, que promueve la producción de DAG e IP_3 , éste último induce la salida de Ca^{2+} del RE, el cual lleva la activación de ERK 1/2. El DAG, también contribuye a la activación de la vía mediante la activación de las PKC (Wang et al., 2007). Otro mecanismo, independiente de Ca^{2+} , y que es el principal en la contribución a la activación de ERK 1/2, involucra la transactivación de receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK; Kim et al., 2008). Esta vía requiere la activación de

las subunidades $G\beta\gamma$ de las proteínas G triméricas, y de la cinasa de tirosina Src, pero no de la PLC ni del Ca^{2+} (Wang et al., 2007).

ANTECEDENTES

Se ha demostrado la presencia de receptores de glutamato en las células del epitelio pigmentado de la retina de pollo (López-Colomé et al., 1993) y de humano (López-Colomé et al., 1994), ambos con características farmacológicas similares. Asimismo, se sabe que el glutamato, mediante el aumento de la expresión del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), aumenta la proliferación de estas células (Uchida et al., 1998). Por otro lado, se sabe que en algunas enfermedades oculares en las que hay desprendimiento de la retina aumenta la concentración de glutamato en el humor vítreo (Barber, 2003; Marc et al., 2004; Diederer et al., 2006); y varios estudios han demostrado que el glutamato, mediante la activación de sus receptores ionotrópicos y metabotrópicos, activan la vía de las MAP cinasas ERK 1/2 (Thomas y Huganir, 2004; Wang et al., 2007).

HIPOTESIS

Dado que la activación de las MAP cinasas ERK 1/2 regula la progresión del ciclo celular, y que esta vía responde positivamente a la estimulación de los receptores de glutamato, la hipótesis de este trabajo es que el glutamato, el cual aumenta su concentración en la cavidad vítrea en condiciones patológicas, participa en la inducción de la proliferación de las células del EPR mediante la estimulación de receptores específicos; y que la activación de estos receptores llevan a la activación de la vía de ERK 1/2 para inducir la proliferación.

OBJETIVOS

1. Analizar el efecto del glutamato sobre la proliferación celular, usando como sistemas modelo los cultivos primarios del epitelio pigmentado de la retina de pollo y la línea celular derivada de humano ARPE-19.
2. Caracterizar la activación de la vía de ERK1/2 cuando se estimula farmacológicamente a los subtipos de receptores de glutamato.
3. Evaluar la contribución de la vía de ERK1/2, activada por glutamato, en la proliferación de las células del EPR.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo de células de EPR

El cultivo primario de epitelio pigmentado de la retina de pollo se llevó a cabo con un método descrito previamente (López-Colomé et al., 1993). A los embriones de pollo de siete días de desarrollo se les extrajo la copa óptica. En condiciones de esterilidad, se hizo un corte ecuatorial y se extrajo el EPR de la parte posterior. El tejido se lavó con buffer de bicarbonatos Ringer Krebs (RKB), pH 7.4, el cual contiene NaCl 118 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, KCl 4.7 mM, CaCl_2 2.5 mM, MgSO_4 1.17 mM, glucosa 5.6 mM, NaHCO_3 34.5 mM y 1% de antibiótico penicilina-neomicina-estreptomicina (PNS). Se centrifugó 5 minutos a 1000 rpm a temperatura ambiente. Este lavado se repitió 4 veces. Posteriormente, se agregó tripsina al 0.13 % en PBS durante 10 minutos a 37° C, agitando de dos a tres veces durante la incubación para disociar el tejido. Para detener la reacción de la tripsina, se agregó medio Opti-Mem (GibcoBRL) con 4% de suero fetal bovino (FBS) y 1% PNS a 37° C. Se volvió a centrifugar la suspensión; el sobrenadante se eliminó por decantación. Al pellet obtenido se le agregó Opti-Mem con 4% FBS y se homogenizó antes de pasarlo por una malla de nylon de 50 μm de poro. Se tomaron 20 μl para cuantificar las células. Las células se sembraron en multipozos de 3.5 mm de diámetro (Corning) a una densidad de 5×10^5 células por pozo, y se incubaron a 37° C en Opti-Mem con 4% FBS y antibiótico, en una atmósfera de 5% de CO_2 hasta su uso (3-5 días). La morfología de las células se evaluó por microscopía óptica. La línea celular, ARPE-19 (ATCC), derivada de EPR humano se sembró en medio D-MEM/F12 (ATCC) suplementado con 4% de FBS, como se ha reportado previamente (Dunn et al., 1996)

Ensayos de proliferación celular

La proliferación de las células de EPR se midió por la incorporación de timidina tritiada. Las células se sembraron en medio Opti-Mem con 4% FBS y se mantuvieron así durante 24 horas. Este medio se reemplazó por uno que contenía 1% de FBS y se matuvo durante 12 horas. Posteriormente, se le

agregó al medio el estímulo: L-glutamato 1 mM, amino-ciclopentano-1,3-ácido dicarboxílico (ACPD) 150 μ M, α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) 150 μ M, o N-metil-D-aspartato (NMDA) 150 μ M (Sigma, Tocris). Cuando se utilizaron antagonistas de los receptores de glutamato o los inhibidores de las vías, se incubaron tres horas antes que los agonistas: α -Metil-4-carboxifenilglicina (MCPG; 50 μ M); 6-Ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX; 10 μ M); maleato de dizocilpina (MK-801, 10 μ M); inhibidores de las CaMK KN-62 o KN-93 10 μ M (Tocris). Después de 24 horas del estímulo, se agregó 0.5 μ Ci/ml de timidina-[3 H] (PerkinElmer; 16 Ci/mmol) y se incubó durante 16 horas, aproximadamente. Posteriormente, los cultivos se lavaron dos veces con PBS y se incubaron 1 hora con ácido tricloroacético 10%; se solubilizaron en sodio dodecil sulfato (SDS) 0.5%. Las muestras se recuperaron en tritosol y se cuantificaron en un contador de centelleo líquido (Beckman).

Protocolo de estimulación de ERK

A las células cultivadas durante 4 días en presencia de 4% de FBS, se les privó de suero durante 12 horas. Posteriormente, se estimularon con glutamato 1 mM o con 150 μ M de los agonistas de los receptores de glutamato, antes mencionados, durante 10 minutos. Cuando se probaron los antagonistas de los receptores de glutamato o los inhibidores de MEK PD98059 (30 μ M), y de las CaMK KN-62 o KN-93 (10 μ M), se adicionaron al medio tres horas antes que los agonistas. Al final del estímulo, las células se lisaron en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, el cual contiene: NaCl 150 mM, EDTA 10mM, SDS 0.1%, Tritón X-100 1%, Chaps 1%, NP40 0.5%, BSA 0.1%, coctel de inhibidores de proteasas 10%, β -glicero-fosfato 40 mM, y pirofosfato de sodio 10 mM (Sigma).

Inmunoprecipitación de ERK

La suspensión obtenida de los lisados se incubó con perlas de sefarosa acopladas a proteína A a 4°C durante una hora para el *pre-cleaning* o pegado inespecífico de la suspensión a las perlas. Se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. Las perlas se incubaron a 4°C durante una hora con el

anticuerpo policlonal anti-ERK1/2 (Calbiochem; 10 µg/ml) para la formación de los complejos inmunes, los cuales se adicionaron al sobrenadante obtenido del pre-cleaning. Se incubaron las muestras a 4°C durante 3 horas para la inmunoprecipitación. Posteriormente, se lavaron tres veces con el buffer de lisis utilizado para inmunoprecipitar y se usaron para los ensayos de activación de ERK1/2.

Ensayo de activación de ERK1/2

Las muestras de ERK1/2 inmunoprecipitada se lavaron 3 veces en buffer Hepes 20 mM, pH 8.0, el cual contiene: MgCl₂ 10 mM, DTT 1mM, EGTA 0.5 mM, y ATP 40 µM. A las muestras se les adicionó 5 µCi de ATP-[³²P] (PerkinElmer Life Science; 6000Ci/mmol), y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Para detener la reacción, se adicionó buffer Hepes con ATP 40 µM, este lavado se repitió tres veces. Posteriormente, se resuspendieron las muestras en buffer Laemmli: Tris-HCl 0.75 M, pH 8.8, SDS 5%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.01%, y se hirvieron durante 5 minutos.

Western Blot

Después del ensayo de activación de ERK1/2, las muestras se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 %, seguida de electrotransferencia a membranas de difluoruro polivinildieno (PVDF; Amersham Biosciences). Las membranas se expusieron en película radiográfica Kodak®. Después de la autorradiografía, se incubaron las membranas en buffer de bloqueo Tween-TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, NaCl 50 mM) con leche 5% y BSA 2% a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario anti-ERK1/2 (dilución 1: 5000) (Calbiochem) durante una hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron cinco veces con TTBS, y se incubaron en el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidada (Zymed Laboratories, Inc.) (dilución 1:10000). Se reveló con un kit de quimioluminiscencia (ECL; Amersham Biosciences). La densidad de las bandas se cuantificó usando el

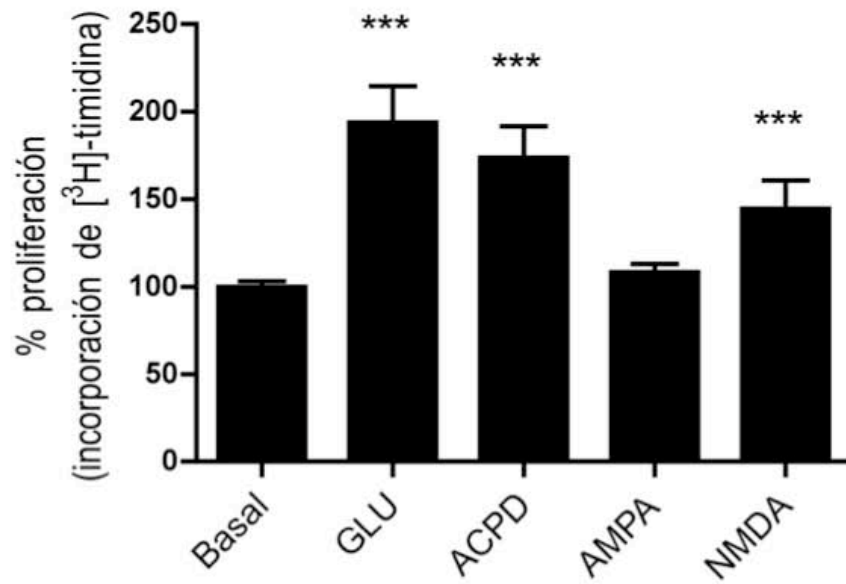
software de análisis Quantity One 1-D (Bio-Rad). Para la detección de anti p-CREB^{Ser133} (Cell Signaling) se utilizó el mismo protocolo.

RESULTADOS

1. La activación de los receptores de glutamato aumenta la proliferación de las células del EPR.

Para estudiar el efecto del glutamato sobre la proliferación, se cultivó a las células de EPR de pollo y ARPE-19 en presencia de glutamato 1 mM. La proliferación se determinó mediante la incorporación de timidina tritiada, ya que esta técnica permite medir la síntesis de DNA. Se usaron como control cultivos sin estimular con glutamato. Los resultados muestran un incremento del 100% en la proliferación de las células que se mantuvieron en medio con glutamato 1mM durante 36 horas, con respecto a los controles (figura 1). Dado que las células de EPR de pollo requieren de suero para sobrevivir, la proliferación se midió en presencia de 1% de suero (Figura 1A). Para comprobar que el glutamato tiene un efecto en la proliferación, adicional al efecto del suero, se llevaron a cabo los mismos ensayos en la línea celular ARPE-19 en ausencia total de suero, ya que estas células sí sobreviven en esas condiciones (Figura 1B). Para identificar la contribución de cada subtipo de receptor sobre la proliferación, se cultivó a las células en presencia de agonistas de glutamato (150 μ M). Se utilizó ACPD, un agonista para los receptores metabotrópicos del grupo I, AMPA, un agonista de los receptores ionotrópicos de tipo AMPA/KA, y NMDA agonista este subtipo de receptor. Los resultados demuestran que el ACPD y el NMDA aumentan significativamente la proliferación, mientras que el AMPA no tiene ningún efecto. Este mismo protocolo se aplicó a los cultivos de ARPE-19, y los resultados son similares. Estos datos indican que los receptores metabotrópicos del tipo I y los de NMDA están involucrados en la proliferación inducida por glutamato.

A



B

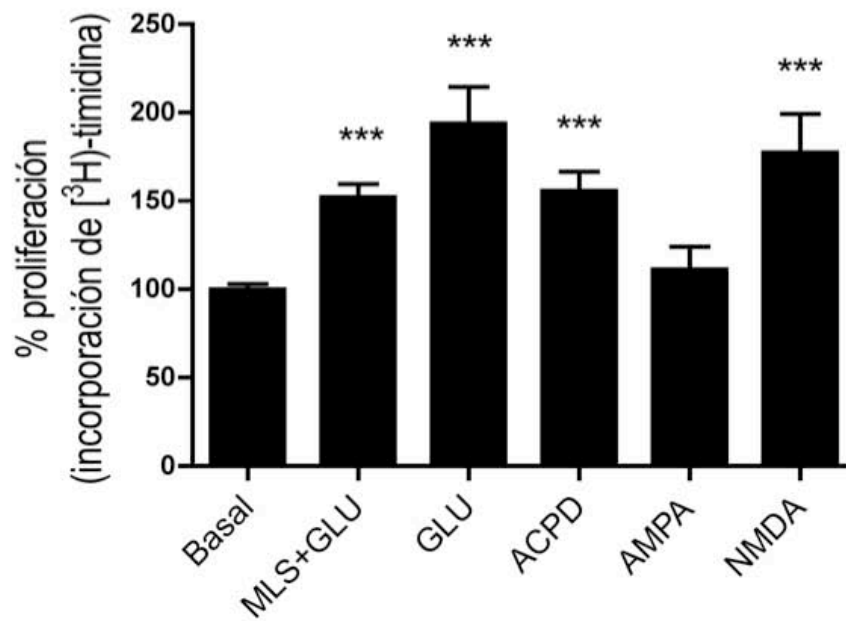


Figura 1. Efecto del glutamato sobre la proliferación de las células del EPR. Las células se cultivaron en presencia de glutamato 1 mM o con los agonistas de los receptores de glutamato (150 μ M) ACPD, AMPA, o NMDA durante 24 horas; se incubaron durante 16 horas más con $[^3\text{H}]$ -timidina. **A:** células de EPR de pollo; **B:** línea celular ARPE-19. Los valores expresan la media \pm E.S.M. de tres experimentos independientes. GLU, glutamato; MLS, medio libre de suero.

2. La proliferación inducida por glutamato se inhibe con antagonistas específicos de los subtipos de receptores.

Para comprobar la especificidad de la contribución de los subtipos de receptores de glutamato (GluR) sobre la proliferación, se trató a las células en cultivo con antagonistas específicos de los subtipos de GluR. Se utilizó MCPG, un antagonista para los receptores metabotrópicos, CNQX, que antagoniza el efecto del AMPA/KA, y MK-801, un bloqueador del canal del NMDAR. Los resultados demuestran que la MCPG y el MK-801 evitan la proliferación inducida por el glutamato (Figura 2). Esto confirma que el glutamato estimula la proliferación mediante la activación de los receptores metabotrópicos y los de NMDA. Aunque la estimulación específica de los receptores de AMPA no promueve la proliferación, el antagonista específico de este receptor sí evitó la proliferación inducida por el glutamato. Este efecto podría explicarse por el hecho de que las quinoxalinas, como la CNQX y la NBQX, además de inhibir a los receptores de AMPA, inhiben de manera no competitiva a los receptores de NMDA, ya que interaccionan con el sitio de la glicina (Michaelis, 1998).

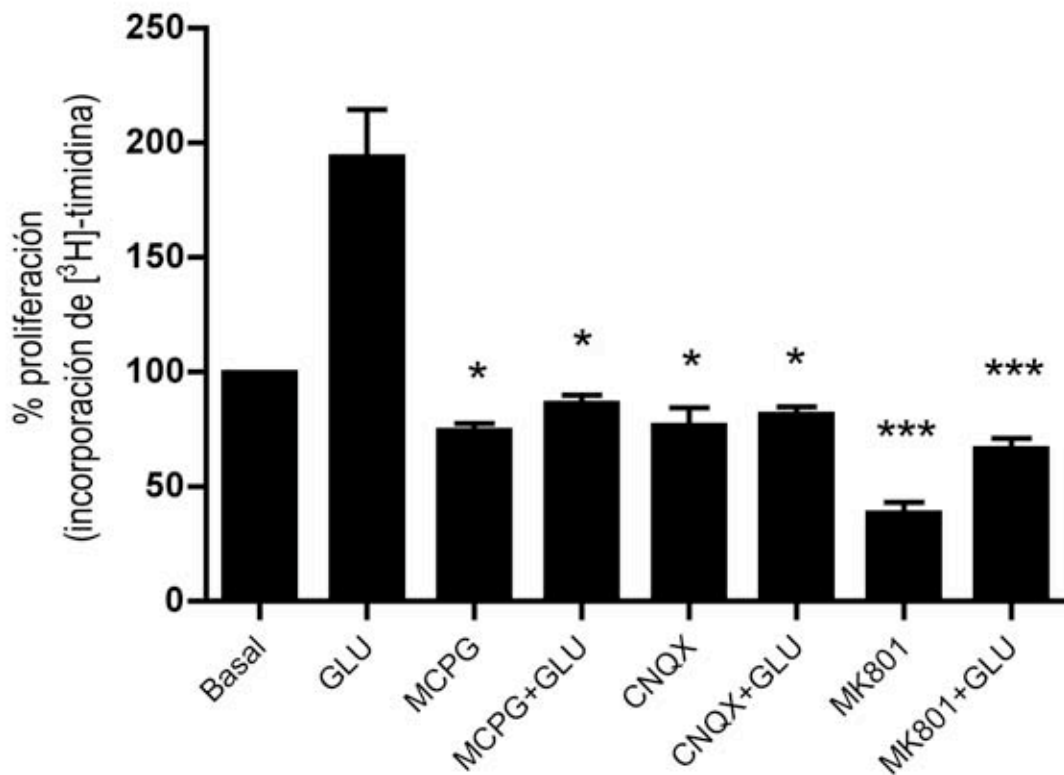


Figura 2. La proliferación inducida con glutamato se inhibe con los antagonistas selectivos de los subtipos de receptores de glutamato. Los antagonistas MCPG (50 μ M), CNQX (10 μ M), y MK801 (10 μ M) se incubaron durante tres horas antes del estimular con glutamato 1mM. La [³H]-timidina se agregó 24 horas después del estímulo y se mantuvo durante 16 horas. Los valores expresan la media \pm E.S.M. de tres experimentos independientes.

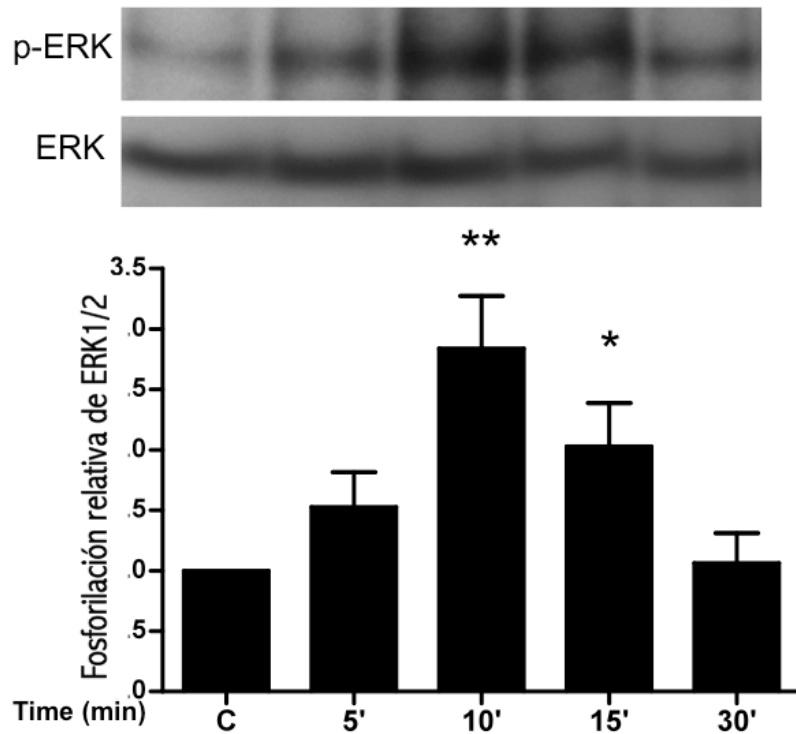
3. La activación de los receptores de glutamato estimula la fosforilación de ERK1/2.

Las MAP cinasas ERK 1/2 son una de las principales vías involucradas en la proliferación celular (Pearson et al., 2001), y se activan en respuesta a neurotransmisores como el glutamato (Wang et al., 2007). Para estudiar la activación de ERK 1/2 por glutamato en las células del EPR se utilizaron ensayos de activación *in vitro* de una cinasa. Como se muestra en la figura 3A, la estimulación con 1mM de glutamato aumenta transitoriamente la fosforilación de ERK 1/2 en células de EPR. La fosforilación máxima de ERK1/2 es a los 10 minutos y regresa al estado basal a los 30 minutos después de la estimulación. Un dato que no se esperaba es que en las muestras de pollo se detecta solamente una banda de ERK, que corresponde a ERK 2. Por esta razón, y para descartar un problema en la técnica utilizada, se analizaron muestras de ARPE-19 para detectar a ERK total mediante Western Blot. Como se observa en la figura 3B, en la muestra ARPE-19 sí se detecta el doblete clásico de p44/p42, lo cual sugiere una diferencia de la expresión de ERK relacionada con la especie, o bien, que el epitope reconocido por el anticuerpo no está presente en la secuencia de ERK 1 en el pollo. Sin embargo, este dato habrá que tomarlo con cuidado, puesto que no se analizó a detalle la expresión de las isoformas de ERK en las especies estudiadas.

Asimismo, se activó a ERK 1/2 estimulando con los agonistas de glutamato ACPD, AMPA y NMDA (150 μ M). Los resultados coinciden con el efecto del glutamato sobre la proliferación, ya que el ACPD y el NMDA activan a ERK 1/2, mientras que el AMPA no tiene ningún efecto (Figura 4A). La especificidad de los subtipos de receptores se evaluó mediante el uso de los antagonistas para cada subtipo de receptor. Como se observa en la figura 4B, el antagonista de

los mGluR, MCPG, y el de los NMDAR, MK-801, evitan la fosforilación de ERK1/2 inducida por glutamato. Este resultado sugiere que el glutamato estimula la proliferación del EPR a través de la activación de ERK1/2 mediada por los receptores metabotrópicos y los de tipo NMDA.

A



B

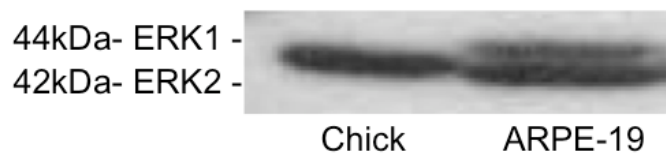


Figura 3. La estimulación de los receptores de glutamato induce la activación de las MAP cinasas ERK1/2. **A:** la activación máxima de ERK se observa a los 10 minutos de estimulación con glutamato 1 mM. La gráfica muestra el análisis densitométrico de los inmunoblot; los valores expresan la media \pm E.S.M. de tres experimentos independientes. **B:** el análisis de la expresión de ERK1/2 en pollo y en ARPE-19 muestra que ERK1 no se detecta en el EPR de pollo.

4. La activación de ERK1/2 se requiere para la proliferación del EPR inducida por glutamato.

Para demostrar la relación causa-efecto entre la fosforilación de ERK 1/2 y la proliferación inducidas por glutamato, se evaluó el efecto del inhibidor de MEK 1/2, PD98059 (30 μ M), sobre la proliferación y la activación de ERK, ya que el único sustrato conocido de MEK 1/2 es ERK 1/2 (Yoon y Seger, 2006). Como se muestra en los resultados, el PD98059 inhibió tanto la proliferación (Figura 5A) como la fosforilación de ERK (Figura 5B) inducidas por la estimulación de los receptores metabotrópicos (mGluR), mientras que este inhibidor no modificó el efecto del NMDA en ningún caso (Figuras 5A y B). Esto sugiere que el glutamato activa dos vías de señalamiento diferentes para inducir la proliferación: por un lado, la estimulación de los mGluR induce la proliferación mediante la activación de la vía de MEK/ERK; mientras que la estimulación de los receptores de NMDA promueve la proliferación por un mecanismo diferente, que posiblemente involucre la entrada de Ca²⁺ a través del canal, esto se infiere por el uso del MK-801, que evita la entrada de Ca²⁺ por el canal.

5. La proliferación del EPR inducida por glutamato involucra a las CaMK.

Se ha demostrado que la fosforilación de ERK inducida por la activación de los receptores de NMDA en neuronas requiere de la activación de las cinasas dependientes de Ca²⁺/Calmodulina (CaMK) (Illario et al., 2002; Schmitt et al., 2005). Dado que ni la proliferación, ni la fosforilación de ERK inducidas por NMDA se bloquearon con el inhibidor de MEK, se probó el efecto de los inhibidores de las CaMK, KN-62 y KN-93, sobre la proliferación y la fosforilación de ERK inducidas por glutamato, ACPD y NMDA. Los resultados demuestran que el KN-62 (10 μ M), no sólo evitó la proliferación inducida por los agonistas, sino que disminuyó la proliferación más allá de los controles basales (Figura 6A). Como se observa en la figura 6B, la activación de ERK inducida por ACPD también se inhibió con el KN-93, lo cual sugiere que las CaMK contribuyen en el señalamiento de los mGluR a la activación de ERK para inducir la proliferación. Sin embargo, aunque la inhibición de las CaMK evitó la proliferación inducida por NMDA (6A), el KN-93 no evitó la fosforilación de ERK

inducida por ese agonista (6B). Esto indica que el NMDA puede estimular la proliferación mediante un mecanismo de señalamiento independiente de MEK 1/2, mediado por las cinasas dependientes de Ca^{2+} /CaM.

6. El glutamato estimula la fosforilación de CREB mediante la activación de ERK1/2.

Dado que se ha demostrado que la estimulación de los receptores de glutamato en neuronas induce la fosforilación de la Ser133 del factor de transcripción CREB mediante un mecanismo dependiente de ERK1/2 (Vanhoutte et al., 1999), en este trabajo se analizó el efecto del glutamato sobre la fosforilación de CREB. Como se observa en la figura 7A, la fosforilación de CREB se detecta desde los 5 minutos de estimulación con glutamato, alcanza un valor máximo a los 10 minutos, y regresa al nivel basal a los 30 minutos. Este estímulo se llevó a cabo con ACPD y con NMDA a los 10 minutos, y se inhibió con los antagonistas MCPG y MK-801, para bloquear a los receptores metabotrópicos y a los de NMDA, respectivamente (Figura 7B). Los efectos observados son similares a los correspondientes en la activación de ERK 1/2.

En la figura 8 se muestra que la fosforilación de CREB inducida con glutamato y ACPD se evitó con el inhibidor de MEK 1/2, PD98059. Dado que ni la activación de ERK 1/2 ni la proliferación inducida con NMDA se evitaron al inhibir la vía de ERK 1/2, pero la proliferación se inhibió con el KN-62, se probó el efecto de este fármaco sobre la fosforilación de CREB inducida con NMDA. Como se observa en la figura 8B, el inhibidor de las CaMK no previno la activación de CREB inducida con el NMDA. Este resultado demuestra que el glutamato estimula la proliferación de las células del EPR a través de la activación de diferentes vías. Mientras que el grupo I de los mGluR involucra la activación de MEK/ERK/CREB, los receptores de NMDA requieren de la activación de las CaMK, pero la activación de ERK 1/2 no se relaciona con la proliferación observada.

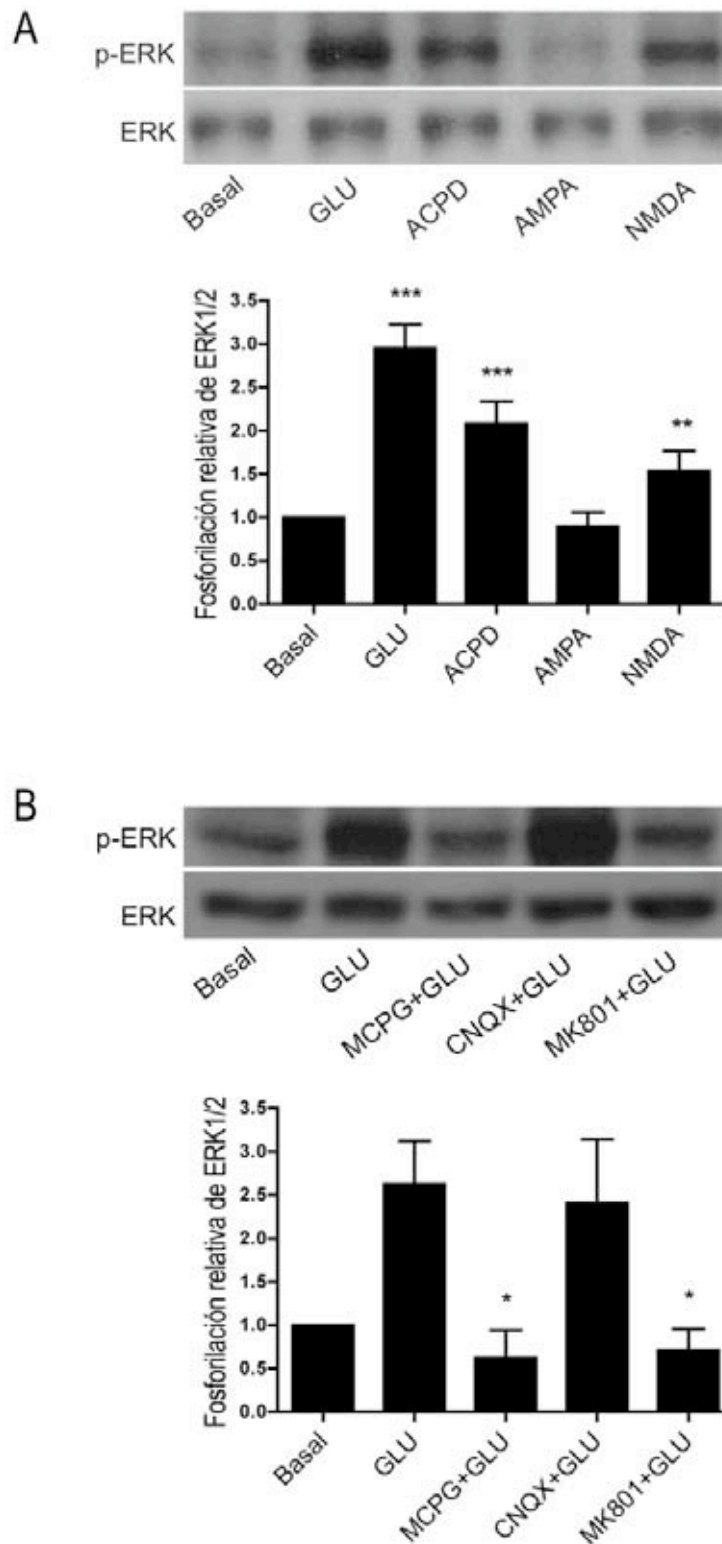


Figura 4. La estimulación de los subtipos de receptores de glutamato activan a ERK en las células del EPR. **A:** Los agonistas específicos de los mGluR (ACPD) y los iGluR (AMPA y NMDA) aumentan diferencialmente la fosforilación de ERK. **B:** la estimulación por glutamato se inhibe con los antagonistas de los mGluR (MCPG) y de los NMDAR (MK-801). Las gráficas representan el análisis densitométrico de los inmunoblots; los valores expresan la media \pm E.S.M. de tres experimentos independientes.

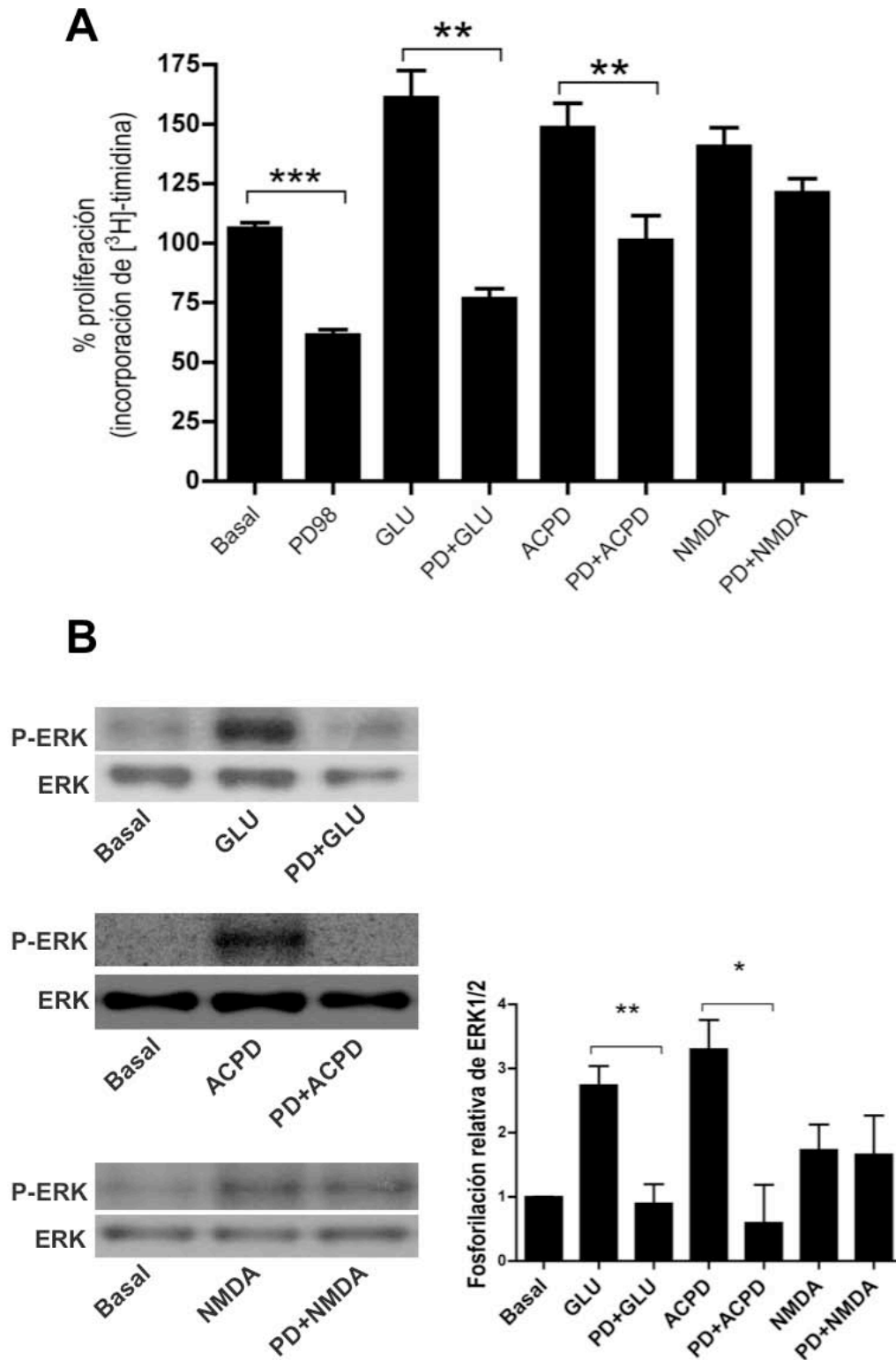


Figura 5. El glutamato estimula la proliferación a través de la activación de ERK. **A:** el inhibidor de MEK, PD98059 (PD; 30 μ M), inhibe la proliferación inducida por glutamato y por ACPD. **B:** El PD98059 evita la fosforilación de ERK inducida por los mGluR, pero no la inducida por los NMDAR. La gráfica representa el análisis densitométrico del inmunoblot. Los valores expresan la media \pm E.S.M. de tres experimentos independientes.

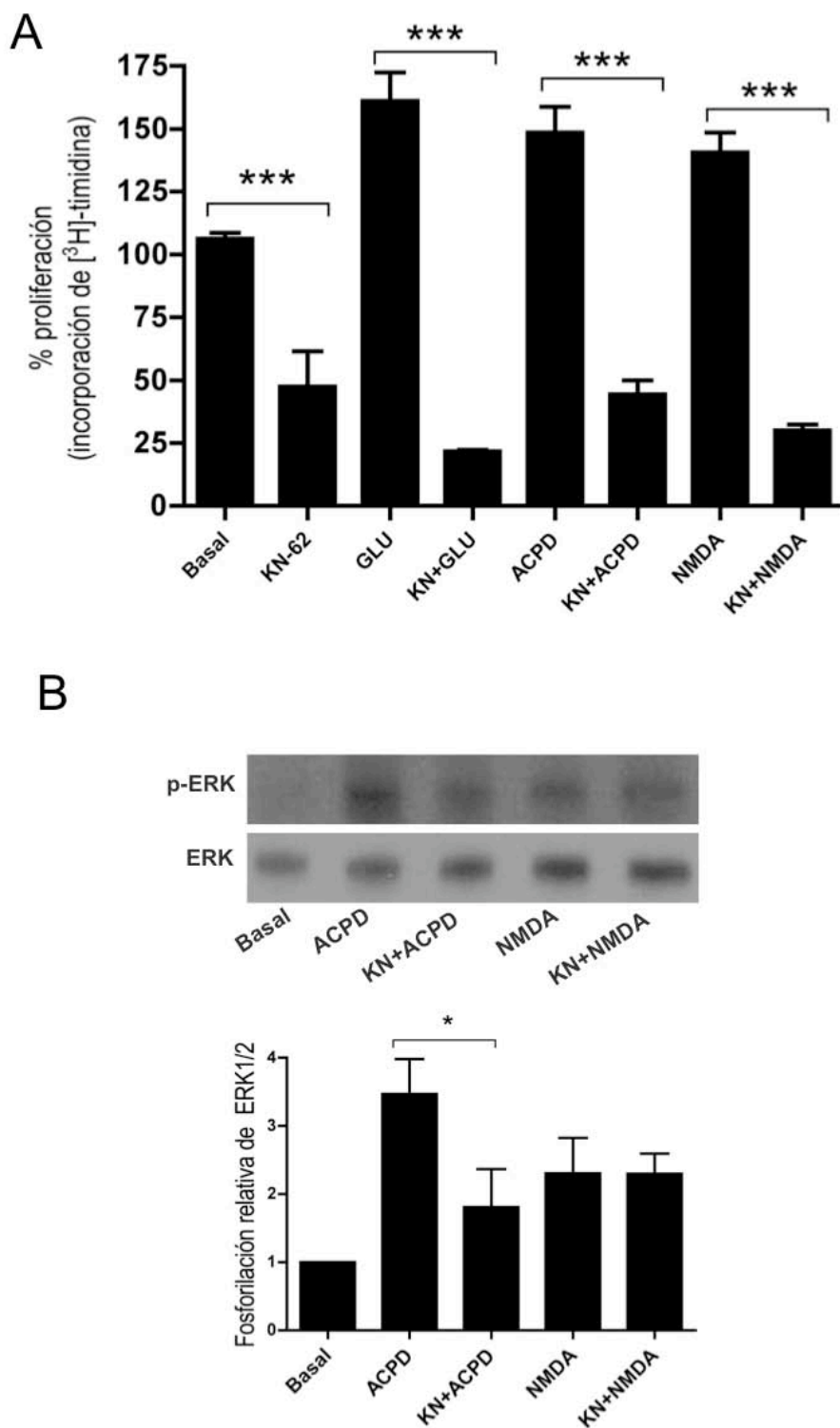


Figura 6. Las CaMK están involucradas en la proliferación inducida por glutamato en las células del EPR. Los inhibidores de las CaMK, KN-62 o KN-93, se incubaron durante 3 horas antes de la estimulación con los agonistas correspondientes. **A:** El KN-62 (KN; 10 μ M) evita la proliferación inducida por la activación de los mGluR (ACPD) y los NMDAR. **B:** El KN-93 (KN; 10 μ M) evita la fosforilación de ERK inducida por ACPD, pero no la inducida por NMDA. Los valores expresan la media \pm E.S.M. de tres experimentos independientes.

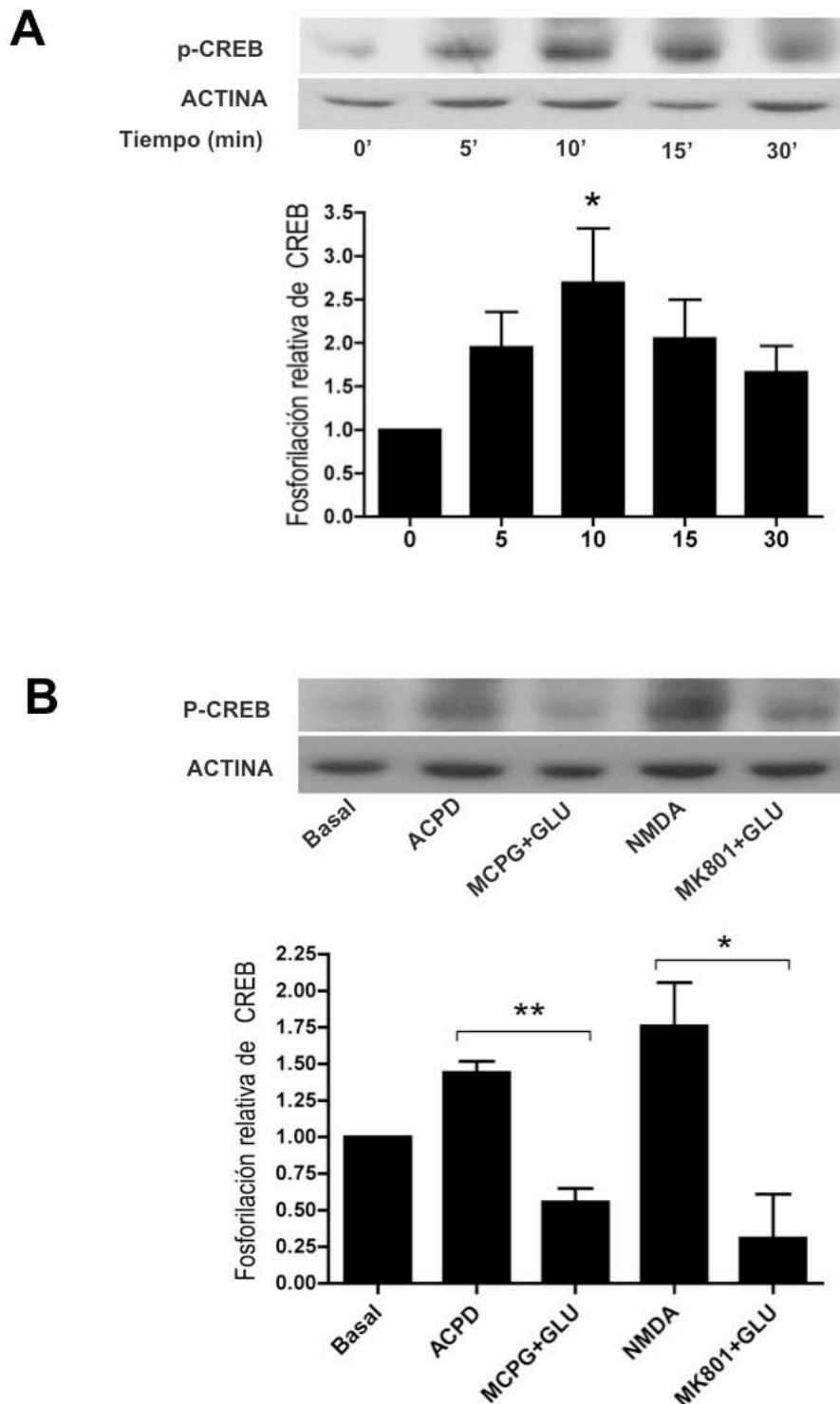


Figura 7. La estimulación de los mGluR y los NMDAR inducen la activación de CREB. **A:** el glutamato 1 mM estimula la fosforilación de CREB temporalmente; la activación máxima es a los 10 minutos. **B:** Los antagonistas de los mGluR (MCPG) y los NMDAR (MK-801) inhiben la activación de CREB inducida por glutamato. Las gráficas muestran el análisis densitométrico de los inmunoblot normalizados con respecto a actina. Los valores expresan la media \pm E.S.M. de tres experimentos independientes.

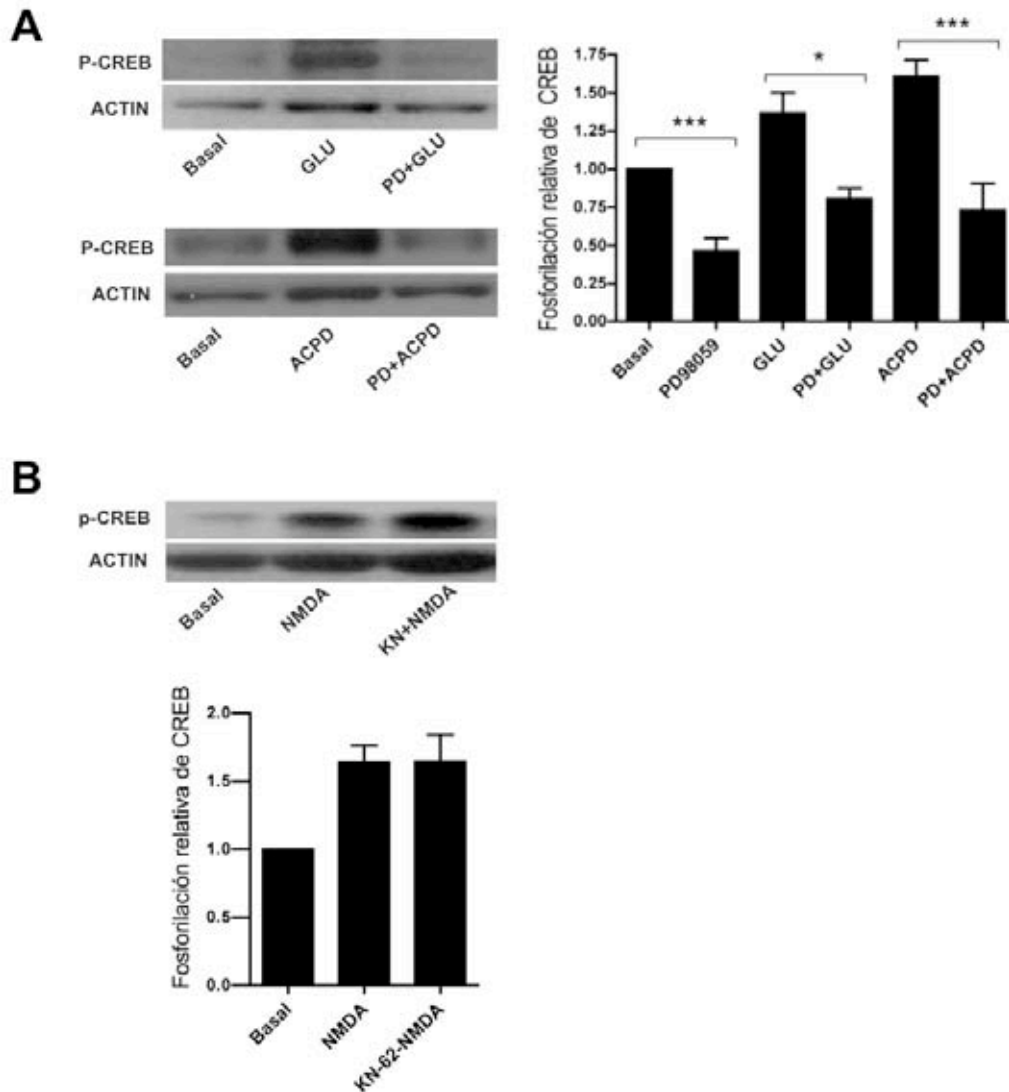


Figura 8. La activación de CREB inducida por glutamato está mediada por la activación de la vía de MEK/ERK. El PD98059 se incubó durante 3 horas previas a la estimulación con los agonistas correspondientes. **A:** El PD98059 inhibe la fosforilación de CREB inducida por glutamato y por ACPD. **B:** La fosforilación de CREB inducida por NMDA no se inhibe con el inhibidor de las CaMK, KN-62. Las gráficas muestran el análisis densitométrico de los inmunoblot normalizados con respecto a actina. Los valores expresan la media \pm E.S.M. de tres experimentos independientes.

DISCUSION

Las alteraciones de la barrera hematorretiniana pueden llevar al desarrollo de retinopatías en las que el epitelio pigmentado de la retina (EPR) juega un papel importante. La degeneración de la retina como consecuencia de la interrupción de esta barrera resulta en la pérdida de la visión. La vitreorretinopatía proliferativa (VRP) es la principal enfermedad en la que se ha estudiado la importancia del EPR (Pastor et al, 2002). Dado que estas células proliferan rápidamente en la cavidad vítrea y forman membranas que se contraen generando el desprendimiento de la retina, es de gran importancia identificar los factores que intervienen. La proliferación es un proceso clave en el desarrollo de la VRP, ya que al ser más abundantes las células en la cavidad vítrea (Fisher et al., 1991), ejercen una mayor tracción de la retina, generando ceguera permanente.

Existen varios trabajos enfocados en el estudio de la proliferación del EPR durante esta patología, la mayoría centrados en el estudio de factores de crecimiento detectados en el vítreo de pacientes con VRP. Al parecer, varios factores están involucrados en la proliferación y la transformación de las células del EPR (Holtkamp et al., 2001; Campochiaro, 1998). Aunque no se ha determinado la concentración del glutamato en las membranas formadas durante la VRP, se ha observado un incremento en los niveles de este aminoácido en el vítreo de pacientes con desprendimiento de retina y en condiciones de hipoxia (Diederer et al., 2006; Marc et al., 2004; Barber, 2003). Tal incremento podría deberse a la disminución de la expresión de los transportadores responsables de remover el glutamato extracelular (Lewis et al., 1989; Li y Puro, 2002; Gadea et al., 2004) presentes en la glía, un componente central en las membranas formadas durante la VRP, las cuales también liberan glutamato en respuesta al estrés osmótico (Takano et al., 2005). Adicionalmente, en condiciones de desprendimiento de la retina o de daño a la barrera hematorretiniana, el glutamato proveniente del suero o de las neuronas dañadas de la retina, que contienen concentraciones milimolares de glutamato (Castillo et al., 1997), podría alcanzar a las células del EPR, las cuales contienen receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos (López-Colomé et al., 1993, 1994). Por lo tanto, en condiciones patológicas *in*

vivo, el aumento del glutamato podría contribuir al desarrollo de la VRP mediante la activación de receptores específicos en las células del EPR.

Se ha demostrado que la estimulación de los receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos en neuronas llevan a la activación de las MAP quinasas ERK 1/2 (Wang et al., 2007; López-Colomé y Ortega, 1997; Thomas y Huganir, 2004), las cuales se sabe que participan en la regulación de procesos como la proliferación, la diferenciación y la sobrevivencia (Pearson et al., 2001). En neuronas, la vía clásica de señalamiento de ERK 1/2, en la que los receptores con actividad de cinasa de tirosina inducen el reclutamiento y activación de la cascada Ras/Raf/MEK/ERK, se activa en respuesta a neurotrofinas (Thomas y Huganir, 2004). Sin embargo, la activación de ERK 1/2 en respuesta a la despolarización de la membrana o al señalamiento por glutamato procede por una vía diferente. En neuronas, la entrada de Ca^{2+} a través de los NMDAR lleva a la fosforilación de ERK 1/2 mediante la activación de otras cinasas como la CaMKII, la PI3K, la PKC, y cinasas de tirosina de la familia de Src (Wang et al., 2007). Los receptores de AMPA que son permeables al Ca^{2+} , activan la vía de ERK mediante la activación de la CaMKII y la PI3K (Perkinton et al., 1999; Sweatt, 2001); los AMPAR que no son permeables al Ca^{2+} , lo hacen mediante la activación de canales de Ca^{2+} de tipo L (Tian y Feig, 2006). Los mGluR del grupo I activan la vía de ERK 1/2 mediante dos mecanismos diferentes: por medio de la subunidad α_q de las proteínas G activan a la PLC β 1 para generar DAG e IP $_3$; éste último induce a la liberación de Ca^{2+} intracelular el cual contribuye a la activación de ERK 1/2 (Wang et al., 2007). El otro mecanismo es independiente de Ca^{2+} , ya que la activación de las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G y de Src, y la subsecuente transactivación de receptores con actividad de cinasa de tirosina como el EGFR llevan a la activación de ERK 1/2 (Kim et al., 2008).

Aunque un reporte previo muestra un efecto indirecto del glutamato sobre la proliferación de las células del EPR (Uchida et al., 1998), y otro independiente muestra que la cascada Ras/Raf/MEK/ERK se activa durante la proliferación del EPR inducida por suero (Hecquet et al., 2002), no se ha demostrado la activación de esta vía por glutamato, ni el aumento de la proliferación inducido por la activación de ERK 1/2 en las células del EPR.

En el presente trabajo se demuestra que el glutamato aumenta la proliferación de las células de EPR de pollo y de la línea celular derivada de humano ARPE-19, mediante la activación de dos vías de señalamiento vinculadas con los receptores de NMDA y los metabotrópicos del grupo I, ya que este efecto se evitó con los antagonistas específicos para estos receptores MK-801 y MCPG, respectivamente. Mientras que el efecto de la estimulación de los mGluR por glutamato y ACPD sobre la proliferación se bloqueó con el inhibidor de MEK 1/2 PD98059, indicando la participación de la vía MEK/ERK (Figura 5), la proliferación inducida por los receptores de NMDA se bloqueó con el inhibidor de las CaMK, KN-62 (Figura 6), pero no con el PD98059, sugiriendo la activación mediada por las CaMK de otra vía independiente de MEK/ERK que lleva a la proliferación.

Para apoyar esta conclusión, se evaluó el efecto de la estimulación de los NMDAR y los mGluR sobre la activación de ERK 1/2. Aunque el ACPD y el NMDA aumentaron el nivel de fosforilación de ERK 1/2 en un grado similar, el efecto inducido por el ACPD se inhibió con el PD98059, sugiriendo la activación de ERK 1/2 por MEK 1/2; pero la fosforilación de ERK 1/2 inducida por NMDA no se modificó con el PD98059 ni con el KN-93.

La falta de efecto del PD98059 y el KN-93 sobre la fosforilación de ERK 1/2 inducida por NMDA descarta la activación de MEK/ERK para inducir la proliferación. Posiblemente la activación de ERK 1/2 por NMDA en las células de EPR no conduzca a proliferación sino a desdiferenciación, pues en nuestro grupo de trabajo se ha estudiado la dinámica del citoesqueleto en EPR de rata, y se ha observado que en presencia de glutamato aumentan las fibras de estrés, efecto que es inhibido con el PD98059 (Pacheco Domínguez et al., 2008). Posiblemente esta vía también esté involucrada en la migración de estas células, pero aún no se ha estudiado este fenómeno.

Asimismo, se sugiere que el aumento de la fosforilación de ERK 1/2 podría derivar de la disminución de la desfosforilación debido a la inactivación de las fosfatasa de la vía de ERK 1/2, que posiblemente se deba a la inhibición de un mecanismo de activación mediado por las CaMK (Lin y Yang, 2006). Se ha documentado que la fosforilación de ERK 1/2 inducida por NMDA está regulada por la fosfatasa de tirosina abundante en el estriado STEP, la cual inicia la desfosforilación de ERK (Zhou et al., 2002). STEP depende de la PP2B o

calcineurina para ser activada y desfosforilar a ERK 1/2 (Paul et al. 2003). Esto podría explicar porqué en nuestro sistema no se observa disminución de la fosforilación de ERK 1/2 cuando inhibimos esta ruta de desfosforilación mediante la inhibición con el KN-93 o el KN-62, los cuales compiten con la calmodulina para inhibir a las CaMK (Sumi et al., 1991), pues la PP2B es una fosfatasa dependiente de Ca^{2+} /CaM.

A este respecto, se ha documentado la regulación de la vía Ras/Raf/MEK/ERK por las CaMK, sin embargo el papel de estas cinasas no está bien definido. Se ha sugerido que la CaMK II juega un papel importante en la activación de ERK 1/2 en respuesta a la activación de los NMDAR en neuronas del estriado (Vanhoutte et al., 1999; Choe y Wang, 2001), y también modula la proliferación mediada por esta vía mediante la activación de Raf-1 (Illario et al., 2002). Asimismo, la posible contribución de las CaMKK y CaMKI y de la PI3K en la fosforilación de ERK en nuestro sistema no se puede excluir, ya que se ha demostrado que la activación de la CaMKI por la CaMKK en neuronas media la activación de ERK inducida por NMDA y por la despolarización de la membrana (Soderling y Stull, 2001; Uezu et al., 2002; Schmitt et al., 2004). Adicionalmente, se ha demostrado que la fosforilación de ERK 1/2 por la activación de los NMDAR durante la potenciación a largo plazo (LTP) requiere de la activación de la CaMKI por la CaMKK (Schmitt et al., 2005). De igual manera, hay reportes recientes que sugieren que la activación de la vía de ERK 1/2 está mediada por la PI3K (Agell et al., 2002; Perkinson et al., 2002).

Tanto la inhibición, con MK-801, de la activación de ERK 1/2 inducida por NMDA como la falta de inhibición, con PD98059, descartan la posible activación de receptores con actividad de cinasa de tirosina por neurotrofinas tales como BDNF, PDGF o bFGF (Uchida et al., 1998), las cuales podrían ser liberadas por la entrada de Ca^{2+} a través de los NMDAR, como una posible causa de este efecto.

En este trabajo se encontró que, además de la inhibición con PD98059, la activación de ERK 1/2 por los mGluR se inhibió con el KN-93. Esto refleja que en nuestro sistema, la formación de IP_3 , debida a la activación de la PLC (Fragoso y López-Colome, 1999), induce la salida de Ca^{2+} del retículo endoplásmico y conduce a la activación de las CaMK, las cuales podrían influir

en la activación de la vía de ERK 1/2. Estos datos sugieren que aunque la inducción de la proliferación celular por la activación de los mGluR se lleva a cabo principalmente por la vía de MEK/ERK, la activación de las CaMK contribuye a este efecto. Se han propuesto dos vías que conducen a la activación de la vía de ERK 1/2 por la estimulación de los mGluR del grupo I. Una principal independiente de Ca^{2+} , que por transactivación de receptores con actividad de cinasa de tirosina conduce a la activación de ERK (Kim et al., 2008). La otra, dependiente de Ca^{2+} , involucra a las PKC, algunas de las cuales también se activa por DAG y llevan a la activación de la vía de ERK1/2 (Shönwasser et al., 1998). Por lo anterior, no se puede descartar la participación de las PKC en la activación de la vía de Raf/MEK/ERK en nuestro sistema, ya que se ha demostrado que todas las isoformas de las PKC activan esta cascada (Schönwasser et al., 1998). De igual manera, habrá que tener en cuenta que el Ca^{2+} proveniente del RE por la activación de los mGluR también activa a las CaMK (Hardingham et al. 2006) y éstas podrían actuar sobre la vía de ERK 1/2, por lo que la exploración de esta ruta podría ser relevante en estudios futuros.

Con la finalidad de determinar el mecanismo por el que ERK 1/2 activada actúa para inducir la proliferación, se analizó el efecto del glutamato y el ACPD sobre la fosforilación del factor de transcripción CREB. De acuerdo con previos trabajos en células neuronales que muestran que las MAPK ERK 1/2 activan a CREB (Xing et al., 1996), se observó que en el EPR, CREB se activa de manera rápida y transitoria que se correlaciona con el tiempo de activación de ERK 1/2, y que se inhibe con el PD98059 (Figura 8A), indicando que la fosforilación de CREB inducida por la activación de los mGluR resulta de la activación de ERK 1/2 inducida por MEK 1/2.

Dado que el PD98059 no modificó el efecto de la estimulación de los receptores de NMDA sobre la proliferación ni sobre la fosforilación de ERK 1/2, solamente se analizó el efecto del KN-62, el cual inhibió la proliferación inducida por el NMDA, sobre la fosforilación de CREB inducida por los NMDAR, y se encontró que este agente no modifica tal activación. Aunque se requiere de más investigación para apoyar esta idea, una explicación posible para este resultado podría ser la inhibición de la calcineurina, una fosfatasa de Ser/thr

dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ que desfosforila la Ser133 de CREB (Shawitz y Greenberg, 1999), por la inhibición de las CaMK con KN-62. En otros sistemas se ha observado que el KN-62 bloquea la fosforilación de la Ser142, pero no el de la Ser133 (Kornhauser et al., 2002), por lo que en el EPR, la activación de CREB a través de los NMDAR podría estar mediada por la fosforilación de la Ser142 por la CaMKII para regular el señalamiento de diversas vías y controlar funciones diferentes (Wu y McMurray, 2001), sin embargo, en este sistema no se ha estudiado tal mecanismo.

El aumento de calcio intracelular activa numerosas vías de señalamiento, con frecuencia opuestas. Esas múltiples acciones dependen, entre otros factores, de la vía de entrada del Ca^{2+} (Shawitz y Greenberg, 1999). En neuronas, el flujo de Ca^{2+} a través de los NMDAR sinápticos activa dos vías de señalamiento, ambas llevan a la fosforilación de CREB en la Ser133: la vía de Ras/ERK y una vía nuclear que posiblemente involucre a la CaMKIV (Agell et al., 2002). La CaMKIV es dependiente de Ca^{2+} , mientras que ERK/RSK no lo son, y consecuentemente se activan más lentamente que las CaMK y su actividad es sostenida. De esta manera, aunque la vía de las CaMK activa a CREB en los primeros segundos del flujo de Ca^{2+} , el reclutamiento de la vía de ERK 1/2 es necesario para prolongar la fosforilación de CREB e inducir la expresión de genes dependiente de CREB, la cual posiblemente requiere la activación de CBP por la CaMKIV (Deisseroth et al., 1998; Hardingham y Bading, 2003).

En nuestro modelo, el aumento en la fosforilación de CREB ya sea por la activación de MEK/ERK, en el caso de la activación de los mGluR, o por la disminución de la desfosforilación de ERK o por la activación de las CaMK, en el caso de de la activación de los NMDAR, podría promover la expresión de genes involucrados en la progresión del ciclo celular (Chang et al., 2003; Roux y Blenis, 2004), estimulando de esta manera la proliferación. Además, se ha demostrado que el aumento en la expresión de la ciclina D1 debida a la activación de ERK 1/2 inducida por suero aumenta la proliferación de las células del EPR (Hecquet et al., 2002). El hecho de que el KN-62 no inhibió la fosforilación de CREB, pero sí la proliferación inducida por NMDA, indica que las CaMK participan en la proliferación inducida por la activación de los receptores de glutamato por una vía nuclear como la activación de la CaMKIV,

consistente con una acción en la regulación del ciclo celular, o bien, mediante la activación de otro factor de transcripción.

Se encontró que la estimulación de la proliferación por ACPD (mGluR) se inhibió con el PD98059, mientras que la inducida por NMDA no, sin embargo, el efecto de ambos agonistas sobre la proliferación se bloqueó completamente con el KN-62, sugiriendo que, además de la posible activación de Ras/Raf/MEK/ERK por las CaMK debida al aumento de Ca^{2+} mediado por los mGluR, las CaMK también participan en la regulación de la proliferación inducida por ambos subtipos de receptores, posiblemente mediante el incremento de la actividad de las CaMK, tanto nucleares como citoplásmicas, independientemente de CREB.

La vía dependiente de Ca^{2+} /CaM que regula la progresión del ciclo celular permanece ambigua, sin embargo, la activación de la transcripción de genes específicos involucrados en este proceso requiere la actividad de las CaMK (Kahl y Means, 2003). La inducción de la proliferación requiere, particularmente, la expresión de ciclinas las cuales controlan la progresión del ciclo celular mediante la interacción y la activación de las cinasas dependientes de ciclinas (CDK). Nuestros resultados demuestran que el KN-62 no sólo inhibe la proliferación inducida por los mGluR, sino que además disminuye la proliferación basal de las células del EPR (Figura 6A), esto concuerda con previos reportes que demuestran que el KN-62 evita la progresión de la fase G1 del ciclo celular tanto en células normales como en células transformadas (Kahl y Means, 2003; Choi y Husain, 2006). Esto podría explicar también la inhibición de la proliferación inducida por los NMDAR con el KN-62, debido al aumento del Ca^{2+} mediado por el NMDAR y la consecuente activación de las CaMK. Aunque se ha sugerido que el KN-62 podría ser específico de la CaMKII, en realidad inhibe a todas las isoformas (Hidaka y Yokokura, 1996). Dado que la CaMKIV se localiza predominantemente en el núcleo (Hardingham et al., 1997), ésta podría ser el punto de convergencia de los estímulos independientes de los NMDAR y los mGluR, pues el Ca^{2+} que entra por los NMDAR y el liberado del RE por la activación de los mGluR podría tener un efecto sinérgico sobre las CaMK, principales sensoras del aumento del intracelular (Soderling et al., 2001). Además, cada vez hay mayor evidencia de que las CaMKIV son las principales activadoras de CREB en respuesta a la

entrada de calcio (Bito et al., 1996). Aunque no se tiene evidencia experimental de que este sea el caso, se puede deducir por la inhibición con el KN-62 de la proliferación inducida por los mGluR y los NMDAR, que las CaMK son una vía concurrente en la proliferación inducida por glutamato en las células del EPR.

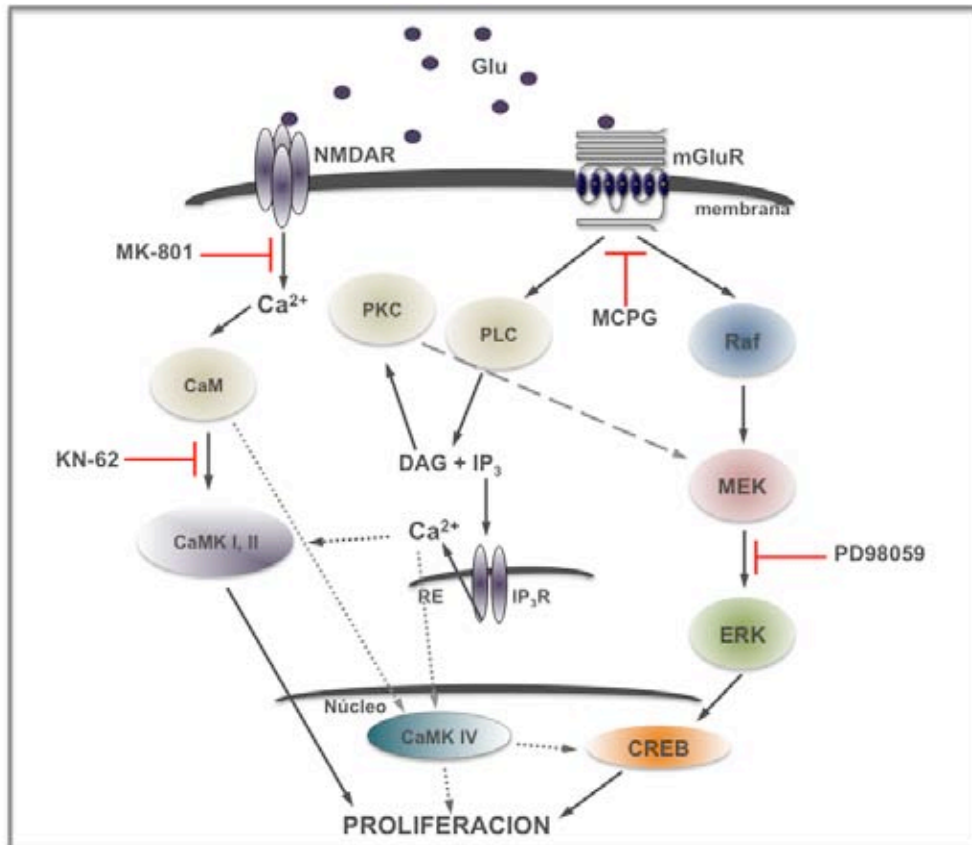


Figura 9. Representación esquemática de la vía conducente a la proliferación de las células del EPR inducida por glutamato. La activación de los mGluR y los NMDAR, en respuesta al aumento del glutamato extracelular, inducen la proliferación mediante la activación de vías diferentes. La inhibición de MEK evita la proliferación inducida por los mGluR, pero no la inducida por los NMDAR. La inhibición de las CaMK evita la proliferación inducida por los mGluR y los NMDAR, sugiriendo la convergencia de estas dos vías a nivel de núcleo, posiblemente en la CaMK IV (líneas punteadas). RE, retículo en doplámico; IP₃R, receptor de IP₃. La línea discontinua es una vía que no se estudió, pero que no se descarta.

CONCLUSIÓN

En el presente estudio se demostró que el glutamato activa dos vías paralelas que llevan a la fosforilación de ERK1/2 y de CREB en las células del EPR mediante la activación de los receptores metabotrópicos del grupo I y de los de tipo NMDA. También se muestra que la estimulación independiente de ambas vías aumenta la proliferación de las células del EPR de manera dependiente de las CaMK (Figura 9). Estos resultados sugieren que en condiciones patológicas o procedimientos quirúrgicos en los que la barrera hematorretiniana está comprometida, el aumento del glutamato extracelular podría estar involucrado en la modificación de la expresión de genes llevando al incremento de la proliferación de las células del EPR, por lo que se propone que es necesario considerar la participación del glutamato en el desarrollo de la vitreorretinopatía proliferativa.

RELEVANCIA

La prevención de la VRP es de gran importancia clínica, para lo cual es necesario no sólo identificar y entender los factores de riesgo que predisponen al desarrollo de este padecimiento, sino investigar los mecanismos moleculares que llevan a la transformación de las células del EPR. Aunque hay varios trabajos dirigidos al estudio de la proliferación del EPR durante esta patología, el papel del glutamato no se ha caracterizado. En nuestro modelo de estudio, el glutamato influye de manera importante en la proliferación de las células del EPR mediante la activación de las MAP cinasas ERK 1/2 y la posterior activación de CREB. La identificación de las vías de señalamiento involucradas en la proliferación serán de gran utilidad en el desarrollo de métodos más selectivos para el tratamiento tanto de la VRP como de otras patologías en las que se altera la proliferación celular. Tales métodos se pueden basar en el mecanismo de señalamiento mediado por los receptores de glutamato, ya que se ha reportado el efecto antiproliferativo de algunos antagonistas de los NMDAR en adenocarcinomas y neuroblastomas (Stepulak et al., 2005), y de antagonistas de los AMPAR en varios tipos de cáncer (Rzeski, et al., 2002).

Asimismo, varios grupos están tratando de identificar inhibidores de la cascada Ras/Raf/MEK/ERK (Friday y Adjei, 2008), así como de la vía de las CaMK (Shim et al., 2007) como una herramienta terapéutica en el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

REFERENCIAS

Abe T, Sato M, Tamai M. (1998). Dedifferentiation of the retinal pigment epithelium compared to the proliferative membranes of proliferative vitreoretinopathy. *Curr Eye Res* 17:1103-1109.

Agell N, Bacha O, Rocamora N, Villalonga P. (2002). Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca^{2+} , and calmodulin. *Cell Sign* 14: 649-54.

Ando A, Ueda M, Uyama M, Masu Y, Ito S. (2000). Enhancement of dedifferentiation and myoid differentiation of retinal pigment epithelial cells by platelet derived growth factor. *Br J Ophthalmol* 84:1306-1311.

Barber AJ. (2003). A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psych*. 27: 283 – 290.

Besharse, J.C. y Defoe, D.M. (1998). Role of the retinal pigment epithelium in photoreceptor membrane turnover. En *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor, M.F. y Wolfensberger, T.J. Pags. 152-172.

Birchmeier C. (1993). Molecular aspects of mesenchymal-epithelial interactions. *Annu Rev Cell Biol*. 9: 511 – 540.

Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. (1996). CREB Phosphorylation and dephosphorylation: A Ca^{2+} - and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87: 1203-14.

Bonni A, Ginty DD, Dudek H, Greenberg ME. (1995). Serine 133-phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that may confer specificity to neurotrophin signals. *Mol Cell Neurosci*. 6(2): 168-83.

Boulton M, Dayhaw-Barker P. (2001). The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye* 15: 384 – 389.

Bytyqi AH, Bachmabb G, Rieke M, Paraoanu LE, Layer PG. (2007). Cell-by-cell reconstruction in reagggregates from neonatal gerbil retina begins from the inner retina and is promoted by retinal pigment epithelium. *Eur J Neurosci*. 26: 1560-1574.

Cai, H., Smola, U., Wixler, V., Eisenmann-Tappe, I., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J., et al. (1997). Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in

growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol Cell Biol*, 17(2), 732-741.

Campochiaro P A. (1998). Growth factors in the retinal pigment epithelium and retina. En *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor, M.F. y wolfensberger, T.J. Pags. 459-477.

Casaroli-Marano RP, Pagan R, Vilaro S. (1999). Epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy: intermediate filament protein expression in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 40:2062-2072.

Castillo J, Davalos A, Noya M. (1997). Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet* 349:79-83.

Chang F, Steelman LS, Shelton JG, Lee JT, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin R, McCubrey JA. (2003). Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol* 22:469-80.

Chatterton J, Awobuluyi M, Premkumar L, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino K, Nakanishi N, Tong G, Lipton S, Zhang D. (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415 (6873): 793 – 798.

Chaudhary, A., King, W. G., Mattaliano, M. D., Frost, J. A., Diaz, B., Morrison, D. K., et al. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. *Curr Biol*. 10(9), 551-554.

Chawla S, Hardingham GE, Quinn DR, Bading H. (1998). CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science*. 281(5382): 1505-9.

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, et. al. (2001). MAP kinases. *Chem Rev*. 101(8):2449-76.

Cheng, J. J., Wung, B. S., Chao, Y. J., & Wang, D. L. (2001). Sequential activation of protein kinase C (PKC)-alpha and PKC-epsilon contributes to sustained Raf/ERK1/2 activation in endothelial cells under mechanical strain. *J Biol Chem*, 276(33), 31368-31375.

Chong, H., Vikis, H. G., & Guan, K. L. (2003). Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal*. 15(5), 463-469.

Choe ES, Wang JQ. (2001). Group I metabotropic glutamate receptors control phosphorylation of CREB, Elk-1 and ERK via a CaMKII-dependent pathway in rat striatum. *Neurosci Lett.* 313:129-32.

Choi J, Husain M, (2006). Calmodulin-mediated cell cycle regulation. *Cell Cycle* 5: 2183-2186.

Conn PJ, Pin JP. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37:205-237.

Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Op Neurobiol.* 11: 327 – 335.

Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W, Chen HS, Lipton SA, Nakanishi N. (1998). Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 393 (6683): 377 – 381.

Dhillon, A. S., & Kolch, W. (2002). Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch Biochem Biophys.* 404(1), 3-9.

Diederens RM, La Heij EC, Deutz NE, Kijlstra A, Kessels AG, van Eijk HM, Liem AT, Dieudonne S, Hendrikse F. (2006). Increased glutamate levels in the vitreous of patients with retinal detachment. *Exp Eye Res.* 83:45-50.

Deisseroth K, Heist EK, Tsien RW. (1998). Calmodulin translocation to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* 392:198-202.

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev.* 51(1):7-63.

Dowling JE. (1970). Organization of vertebrate retinas. *Invest Ophthalmol.* 9:655-680.

Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. (1996). ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res.* 62:155-69.

Ershov AV, Bazan NG. (2000). Photoreceptor phagocytosis selectively activates PPARgamma expression in retinal pigment epithelial cells. *J Neurosci. Res* 60:328-337.

Fagni L, Ango F, Perroy J, Bockaert J. (2004). Identification and functional roles of metabotropic glutamate receptor-interacting proteins. *Semin Cell Dev Biol.* 15:289-298.

Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME. (1997). CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron.*19(5): 1031-47.

Fisher SK, Erickson PA, Lewis GP, Anderson DH. (1991). Intraretinal proliferation induced by retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32(6): 1739-48.

Fragoso G, Lopez-Colome AM. (1999). Excitatory amino acid-induced inositol phosphate formation in cultured retinal pigment epithelium. *Vis Neurosci.* 16:263-269.

Friday B. B. y Alex A. Adjei A. A. (2008). Advances in Targeting the Ras/Raf/MEK/Erk Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade with MEK Inhibitors for Cancer Therapy

Fukunaga K, Miyamoto E (1998): Role of MAP kinase in neurons. *Mol Neurobiol.* 16:79-95.

Gadea A, Lopez E, Lopez-Colome AM. (2004). Glutamate-induced inhibition of D-aspartate uptake in Muller glia from the retina. *Neurochem Res.* 29:295-304.

Ginnan, R., & Singer, H. A. (2002). CaM kinase II-dependent activation of tyrosine kinases and ERK1/2 in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol,* 282(4), C754-761.

Grierson I, Heathcote L, Hiscott P, Hogg P, Briggs M, Hagan S. (2000). Hepatocyte growth factor/scatter factor in the eye. *Prog Retin Eye Res.* 19:779-802.

Ginty DD, Bonni A, Greenberg ME. (1994). Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* 77(5): 713-25.

Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H. (1997). Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 385(6613): 260-5.

Hardingham GE, Bading H. (2003). The Yin and Yang of NMDA receptor signaling. *TRENDS Neurosc.* 26: 81-89.

Hardingham NR, Bannister NJ, Read JC, Fox KD, Hardingham GE, Jack JJ. (2006). Extracellular calcium regulates postsynaptic efficacy through group 1 metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci.* 26(23):6337-45.

Hecquet C, Lefevre G, Valtink M, Engelmann K, and Mascarelli F. (2002). Activation and role of MAP kinase-dependent pathways in retinal pigment epithelial cells: ERK and RPE cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:3091-3098.

Hecquet C, Lefevre G, Valtink M, Engelmann K, and Mascarelli F. (2002). cAMP inhibits the proliferation of retinal pigmented epithelial cells through the inhibition of ERK1/2 in a PKA-independent manner. *Oncogene* 21: 6101-6112.

Huettner JE. (2003). Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog Neurobiol.* 70(5): 387-407.

Hidaka H, Yokokura H. (1996). Molecular and cellular pharmacology of a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaM kinase II) inhibitor, KN-62, and proposal of CaM kinase phosphorylation cascades. *Adv Pharmacol.* 36 : 193-219.

Holtkamp GM, Kijlstra A, Peek R, de Vos AF. (2001). Retinal pigment epithelium-immune system interactions: cytokine production and cytokine-induced changes. *Prog Retin Eye Res.* 20:29-48.

Hughes, B.A., Gallemore, R.P., Miller, S.S. (1998). Transport mechanism in the retinal pigment epithelium. En *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds. : Marmor, M.F. y wolfensberger, T.J. Pags. 103-134.

Illario M, Cavallo AL, Bayer KU, Di Matola T, Fenzi G, Rossi G, Vitale M. (2002). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II binds to Raf-1 and modulates integrin-stimulated ERK activation. *J Biol Chem.* 278: 45101 - 8.

Jaumot, M., & Hancock, J. F. (2001). Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* 20(30), 3949-3958.

Jin M, Barron E, He S, Ryan SJ, Hinton DR. (2002). Regulation of RPE intercellular junction integrity and function by hepatocyte growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:2782-2790.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. (2000). Principles of neural science, 4a ed. MacGraw-Hill, New York. pp. 1414.

Kahl CR, Means A. 2003. Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev.* 24: 719-36.

Keely, S. J., Calandrella, S. O., & Barrett, K. E. (2000). Carbachol-stimulated transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T(84) cells is mediated by intracellular Ca^{2+} , PYK-2, and p60(src). *J Biol Chem*, 275(17), 12619-12625.

Kew JN, Kemp JA. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacol.* 179: 4 – 29.

Kim CH, Lee J, Lee J-Y, Roche KW. (2008). Metabotropic glutamate receptors: phosphorylation and receptor signaling. *J Neurosc Res.* 86: 1 – 10.

King, A. J., Sun, H., Diaz, B., Barnard, D., Miao, W., Bagrodia, S., et al. (1998). The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* 396(6707), 180-183.

Kon CH, Occleston NL, Alyward GW, Khaw PT. (1999). Expression of vitreous cytokines in proliferative vitreoretinopathy: a prospective study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40: 705 – 712.

Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., et al. (1993). Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*, 364(6434), 249-252.

Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* 351 Pt 2, 289-305.

Kolch, W., Calder, M., & Gilbert, D. (2005). When kinases meet mathematics: the systems biology of MAPK signalling. *FEBS Lett.* 579(8), 1891-1895.

Kornhauser JM, Cowan CW, Shaywitz AJ, Dolmetsch RE, Griffith EC, Hu LS, Haddad C, Xia Z, y Greenberg ME. (2002). CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events. *Neuron* 34: 221-223.

Krishna M, Narag H. (2008). The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci.* 65(22):3525-44.

Kubo M, Ito E. (2004). Structural dynamics of an ionotropic glutamate receptor. *Prot: Struct funct bioinformat.* 56: 411 – 419.

Le Good, J. A., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P., & Parker, P. J. (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science*, 281(5385), 2042-2045.

Lee, Y. J., Soh, J. W., Jeoung, D. I., Cho, C. K., Jhon, G. J., Lee, S. J., et al. (2003). PKC epsilon -mediated ERK1/2 activation involved in radiation-induced cell death in NIH3T3 cells. *Biochim Biophys Acta*, 1593(2-3), 219-229.

Lerma J. (2006). Kainate receptor physiology. *Curr Op Phar* 6: 89 – 97.

Lewis GP, Erickson PA, Guerin CJ, Anderson DH, Fisher SK. (1989). Changes in the expression of specific Muller cell proteins during long-term retinal detachment. *Exp Eye Res.* 49:93-111.

Li Q, Puro DG. (2002). Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43: 3109-16.

Li, W., Chong, H., & Guan, K. L. (2001). Function of the Rho family GTPases in Ras-stimulated Raf activation. *J Biol Chem.* 276(37), 34728-34737.

Liversidge, J. y Forrester, J.V. (1998). Regulation of immune responses by the retinal pigment epithelium. En *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor, M.F. y wolfensberger, T.J. Pags. 511-527.

López-Colomé AM, Salceda R, Fragoso G. (1993). Specific interaction of glutamate with membranes from cultured retinal pigment epithelium. *J Neurosci Res.* 34:454-461.

López-Colomé AM, Fragoso G, Wright CE, Sturman JA. (1994). Excitatory amino acid receptors in membranes from cultured human retinal pigment epithelium. *Curr Eye Res.* 13:553-560.

López-Colomé AM, Ortega A. (1997). Activation of p42 mitogen-activated protein kinase by glutamate in cultured radial glia. *Neurochem Res.* 22 (6): 679-685.

Madden DR. (2002). The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci.* 3:91-101.

Marc, RE.(2004). Retinal neurotransmitters. En *The Visual Neuroscience Vol. 1*. Eds: Chalupa, LM y Werner JS. Pags. 304-319.

Marmor, M.F. (1998). Structure, function, and disease of the retinal pigment epithelium. En *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor, M.F. y Wolfensberger, T.J. Pags. 3-12.

Matsuda K, Kamiya Y, Matsuda S, Yusaki M. (2002). Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Mol Brain Res.* 100: 43 – 52.

McKay, M. M., & Morrison, D. K. (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26(22), 3113-3121.

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

Morrison, D. K., & Cutler, R. E. (1997). The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 9(2), 174-179.

Murphy LO, MacKeigan JP, Blenis J. (2004). A network of immediate early gene products propageâtes subtle différences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration. *Moll Cell Biol.* 24 : 144 – 153.

Murphy, L. O. y Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci.* 31(5):268-75.

Nagasaki H, Shinagawa K, Mochizuki M. (1998). Risk factors for proliferative vitreoretinopathy. *Prog Retin Eye Res.* 17:77-98.

Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, Lee CG, Hurwitz J, Parvin JD, Montminy M. (1997). RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* 90(6): 1107-12.

Nakanishi, H., Brewer, K. A., & Exton, J. H. (1993). Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem,* 268(1), 13-16.

Newman EA. (2004). Glial modulation of synaptic transmission in the retina. *Glia* 47:268-274.

Nguyen-Legros J, Hicks D. (2000). Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *Int Rev Cytol* 196: 245- 313.

O'Neill, E., & Kolch, W. (2004). Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br J Cancer* 90(2), 283-288.

Pacheco-Domínguez RL, Palma-Nicolas JP, López E, López-Colomé AM. (2008). The activation of MEK-ERK1/2 by glutamate receptor-stimulation is involved in the regulation of RPE proliferation and morphologic transformation. *Exp Eye Res.* 86(2):207-19.

Paoletti P, Neyton J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Op Pharmacol.* 7: 39 – 47.

Park, E. R., Eblen, S. T., & Catling, A. D. (2007). MEK1 activation by PAK: a novel mechanism. *Cell Signal,* 19(7), 1488-1496.

Pastor JC, Rodríguez de la Rúa FM. (2002). Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. *Prog Ret Eye Res.* 21:127-144.

Paul S, Nairn AC, Wang P, and Lombroso PJ. (2003). NMDA-mediated activation of the tyrosine phosphatase STEP regulates the duration of ERK signaling. *Nat Neurosc* 6 (1) : 34-42).

Pearson G, Robinson F., et al. (2001). Mitogen-Activated Protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 22: 153-183.

Pellegrini-Giampietro DE, Galli A, Alesiani M, Cherici G, Moroni F. (1989). Quinoxalines interact with the glycine recognition site of NMDA receptors: studies in guinea-pig myenteric plexus and in rat cortical membranes. *Br J Pharmacol.* 98:1281-1286.

Perkinton MS, Ip JK, Wood GL, Crossthwaite AJ, Williams RJ. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase is a central mediator of NMDA receptor signalling to MAP kinase (Erk1/2), Akt/PKB and CREB in striatal neurones. *J Neurochem* 80:239-54.

Robbins SG, Mixon RN, Wilson DJ, Hart CE, Robertson JE, Westra I, Planck SR, Rosenbaum JT. (1994). Platelet-derived growth factor ligands and receptors immunolocalized in proliferative retinal diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35:3649-3663.

Rodríguez-Moreno A, Sihra TS. (2007). Metabotropic actions of kainite receptor in the CNS. *J Neurochem.* 103: 2121 – 2135.

Romano C, Chen Q, y Olney JW. (1998). The interact isolated (*ex vivo*) retina as a model system for the study of excitotoxicity. *Prog Ret Eye Res.* 17 (4): 465-483.

Rosen LB, Greenberg ME. (1996). Stimulation of growth factor receptor signal transduction by activation of voltage-sensitive calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(3): 1113-8.

Roux PP, Blenis J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68:320-44.

Ribinfeld, H. y Seger, R. (2005). The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol.* 31(2): 151-174.

Rzeski W, Ikonomidou C, Turski L. 2002. Glutamate antagonist limit tumor growth. *Biochem Pharmacol.* 64: 1195 – 1200.

Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Das S, Cui J, Talantova MV, Wong HK, Gong X, Chan SF, Zhang D, Nakanishi N, Sucher NJ, Lipton SA. (2002). Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *J Neurophysiol.* 87(4): 2052-63.

Schmitt JM, Wayman GA, Nozaki N, Soderling TR. (2004). Calcium activation of ERK mediated by calmodulin kinase I. *J Biol Chem.* 279: 24064-72.

Schmitt JM, Gire ES, Saneyoshi T, Soderling TR. (2005). Calmodulin-dependent kinase kinase/calmodulin kinase I activity gates extracellular-regulated kinase-dependent long-term potentiation. *J Neurosci.* 25: 1281-90.

Shah, B. H., & Catt, K. J. (2002). Calcium-independent activation of extracellularly regulated kinases 1 and 2 by angiotensin II in hepatic C9 cells: roles of protein kinase Cdelta, Src/proline-rich tyrosine kinase 2, and epidermal growth receptor trans-activation. *Mol Pharmacol,* 61(2), 343-351.

Shaul YD, Seger R. (2007). The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* 1773(8): 1213-26.

Shaywitz AJ, Greenberg ME. (1999). CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem.* 68: 821-61.

Sheng M, McFadden G, Greenberg ME. (1990). Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4(4): 571-82.

Sherry DM, Townes-Anderson. (2000). Rapid glutamatergic alterations in the neural retina induced by retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41 (9): 2779 – 2790.

Shim JS, Lee J, Kim KN, Kwon HJ. (2007). Development of a new Ca²⁺/calmodulin antagonist and its anti-proliferative activity against colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 359: 747-751.

Schönwasser, D. C., Marais, R. M., Marshall, C. J., & Parker, P. J. (1998). Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol,* 18(2), 790-798.

Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. (1998). CREB and memory. *Annu Rev Neurosci.* 21: 127 – 148.

Siu YT, Jin DY. (2007). CREB-a real culprit in oncogenesis. *FEBS J.* 274: 3224-32.

Slack-Davis, J. K., Eblen, S. T., Zecevic, M., Boerner, S. A., Tarcsfalvi, A., Diaz, H. B., et al. (2003). PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation. *J Cell Biol,* 162(2), 281-291.

Soderling TR. (1999). The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem Sci.* 24(6): 232-6.

Soderling TR, Stull JT (2001). Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *Chem Rev.* 101: 2341-52.

Stepulak A, Siffringer M, Rzeski W, Endesfelder S, Gratopp A, Pohl EE, Bittigau P, Felderhoff-Mueser U, Kaindl AM, Buhner C, Hansen HH, Stryjecka-Zimmer M, Turski L, Ikonomidou C. (2005). NMDA antagonist inhibits the extracellular signal-regulated kinase pathway and suppresses cancer growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:15605-10.

Strauss O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 85:845 – 881.

Sumi M, Kiuchi K, Ishikawa T, Ishii A, Hagiwara M, Nagatsu T, and Hidaka H. (1991). The newly synthesized selective Ca²⁺/calmodulin dependent protein

kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 181 (3): 968-75.

Sweatt JD. (2001). The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem.* 76(1): 1-10.

Symons, M. (2000). Adhesion signaling: PAK meets Rac on solid ground. *Curr Biol,* 10(14), R535-537.

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* 81(1): 153-208.

Takano T, Kang J, Jaiswal JK, Simon SM, Lin JH, Yu Y, Li Y, Yang J, Dienel G, Zielke HR, Nedergaard M. (2005). Receptor-mediated glutamate release from volume sensitive channels in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:16466-71.

Takeda, H., Matozaki, T., Takada, T., Noguchi, T., Yamao, T., Tsuda, M., et al. (1999). PI 3-kinase gamma and protein kinase C-zeta mediate RAS-independent activation of MAP kinase by a Gi protein-coupled receptor. *Embo J,* 18(2), 386-395.

Thomas GM, Huganir RL. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 5:173-183.

Thompson DA, Gal A. (2003). Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. *Prog Retin Eye Res.* 22:683-703.

Thoreson WB, Witkovsky P. (1999). Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res.* 18 (6): 765-810.

Tian, K., y Feig, L.A. (2006). Age-dependent participation of Ras-GRF proteins in coupling calcium-permeable AMPA glutamate receptors to Ras/Erk signaling in cortical neurons. *J Biol Chem.* 281 (11): 7578-7582.

Travis GH, Golczak M, Moise AR, Palczewski K. (2007). Diseases caused by defects in the visual cycle: retinoids as potential therapeutic agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47:469-512.

Uchida N, Kiuchi Y, Miyamoto K, Uchida J, Tobe T, Tomita M, Shioda S, Nakai Y, Koide R, Oguchi K. (1998). Glutamate-stimulated proliferation of rat retinal pigment epithelial cells. *Eur J Pharmacol.* 343:265-273.

Ueda, Y., Hirai, S., Osada, S., Suzuki, A., Mizuno, K., & Ohno, S. (1996). Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem*, 271(38), 23512-23519.

Uezu A, Fukunaga K, Kasahara J, Miyamoto E. (2002). Activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurochem*. 82: 585-93.

Vanhoutte P, Barnier JV, Guibert B, Pages C, Besson MJ, Hipskind RA, Caboche J. (1999). Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices. *Mol Cell Biol*. 19:136-46.

Walshe R, Esser P, Wiedemann P, Heimann K. (1992). Proliferative retinal diseases: myofibroblasts cause chronic vitreoretinal traction. *Br J Ophthalmol*. 76(9):550-2.

Wang JQ, Fibuch EE, Mao L. (2007). Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *J Neurochem*. 100:1-11.

Wen-Sheng, W. (2006). Protein kinase C alpha trigger Ras and Raf-independent MEK/ERK activation for TPA-induced growth inhibition of human hepatoma cell HepG2. *Cancer Lett*, 239(1), 27-35.

Wolburg H, Willbold E, Layer PG. (1991). Muller glia endfeet, a basal lamina and the polarity of retinal layers form properly in vitro only in the presence of marginal pigmented epithelium. *Cell Tissue Res*. 264:437-451.

Wu X, McMurray CT. (2001). Calmodulin kinase II attenuation of gene transcription by preventing cAMP response element-binding protein (CREB) dimerization and binding of the CREB-binding protein. *J Biol Chem*. 276(3): 1735-41.

Xing J, Ginty DD, Greenberg ME. (1996). Coupling of the Ras-MAP pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273: 959 – 963.

Yang. S., Yates, P.R., et al. (1998). The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a Mitogen-Activated Protein Kinase targeting motif. *Mol Cell Biol*. 18 (2): 710-720.

Young RW, Bok D. (1969). Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol*. 42:392-403.

Yoon S, Seger R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24(1): 21-44.

Zhou B, Wang ZX, Zhao Y , Brautigan DL, and Zhangw ZY. (2002). The Specificity of Extracellular Signal-regulated Kinase 2 Dephosphorylation by Protein Phosphatases. *J Biol Chem.* 277 (35): 31818 –31825.

Glutamate Accelerates RPE Cell Proliferation Through ERK1/2 Activation Via Distinct Receptor-Specific Mechanisms

Sofía García, Edith López, and Ana María López-Colomé*

Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico, Mexico

Abstract The proliferation and migration of Retinal Pigment Epithelium cells resulting from an epithelial-mesenchymal transition plays a key role in proliferative vitreoretinopathy, which leads to retinal detachment and the loss of vision. In neurons, glutamate has been shown to activate the Ras/Raf/MEK/ERK cascade, which participates in the regulation of proliferation, differentiation, and survival processes. Although glutamate-stimulation and the activation of ERK1/2 by different stimuli have been shown to promote RPE cell proliferation, the signaling pathway(s) linking these effects has not been established. We analyzed the molecular mechanisms leading to glutamate-induced proliferation by determining ERK1/2 and CREB phosphorylation in chick RPE cells in primary culture and the human-derived RPE cell line ARPE-19. This study shows for the first time, that glutamate promotes RPE cell proliferation by activating two distinct signaling pathways linked to selective glutamate receptor subtypes. Results demonstrate that glutamate stimulates RPE cell proliferation as well as ERK and CREB phosphorylation. These effects were mimicked by the mGluR agonist ACPD and by NMDA, and were prevented by the respective receptor inhibitors MCPG and MK-801, indicating a cause-effect relationship between these processes. Whereas mGluR promoted proliferation by activating the MEK/ERK/CREB cascade, NMDA stimulated proliferation through the MEK-independent activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinases. The blockage of both signaling pathways to proliferation by KN-62 suggests the involvement of CaMKs in the control of glutamate-induced proliferation at a common step, downstream of CREB, possibly the regulation of cell cycle progression. Based on these findings, the participation of glutamate in the development of PVR can be considered. *J. Cell. Biochem.* 104: 377–390, 2008. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: cell proliferation; GluRs; ERK1/2; CaMKs; cell cycle

The retinal pigment epithelium (RPE) plays an essential role in the function and maintenance of the neural retina [Strauss, 2005]. Adult retinal pigment epithelial cells are quiescent, differentiated, and reside in the G₀ phase of the cell cycle however, under pathological conditions involving the alteration of the Blood-Retina Barrier (BRB), RPE cells are exposed to a variety of growth factors, cytokines, and

neurotransmitter compounds contained in serum [Limb et al., 1991; Abe et al., 1996]. RPE cell activation results in proliferation, which is a central phenomenon in the pathogenesis of proliferative retinal diseases, such as proliferative vitreoretinopathy (PVR), a major cause of retinal surgery failure [Ando et al., 2000; Pastor et al., 2002]. PVR is characterized by the epithelial-mesenchymal transition of the RPE cells (“fibroblastic transformation”), from mitotically inactive epithelial cells, to actively dividing fibroblast-like cells with the ability to migrate [Grisanti and Guidry, 1995; Casaroli-Marano et al., 1999]. These alterations result in the formation of contractile epiretinal membranes in the vitreous cavity and both surfaces of the retina, mainly composed by transformed RPE cells and glial cells; the contraction of these membranes, eventually causes retinal detachment and the loss of vision [Ando et al., 2000].

Grant sponsor: CONACYT; Grant number: 42640-Q; Grant sponsor: PAPIIT/UNAM; Grant number: IN228203.

*Correspondence to: Ana María López-Colomé, PhD, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D.F., Apartado Postal 70-253, 04510, México, D.F., Mexico.
E-mail: acolome@ifc.unam.mx

Received 24 May 2007; Accepted 5 October 2007

DOI 10.1002/jcb.21633

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

Glutamate, the main excitatory neurotransmitter in the radial signaling pathway of the vertebrate retina [Massey and Miller, 1990] has been shown to regulate the proliferation, migration, and survival of neuronal progenitors and immature neurons [Komuro and Rakic, 1993; Guerrini et al., 1995], and also to play a key role in synaptic plasticity and gene expression, as well as in excitotoxic neuronal death [Thomas and Haganir, 2004; Wang et al., 2007]. Glutamate has been shown to promote RPE cell proliferation indirectly, through an FGF-mediated mechanism [Uchida et al., 1998; Bryckaert et al., 2000]. Additionally, the subunit-expression and pharmacology of glutamate receptors in human trans-differentiated RPE cells differ significantly from those in normal quiescent cells [López-Colomé et al., 1994]. Since the functional properties of GluRs depend on the differential expression and post-transcriptional processing of receptor subunits, such differences could contribute to the alteration of morphology and cell division rate observed in PVR. However, glutamate receptor specific signaling in RPE and its possible involvement in the control of proliferation has not been studied.

Glutamate actions are accomplished through the stimulation of ionotropic receptors (iGluRs) and G protein-coupled metabotropic receptors (mGluRs). The superfamily of iGluRs includes the NMDA, AMPA and KA receptor families, Na^+ - or Ca^{++} -permeable cation channels, whereas eight mGluRs, linked to the activation of second messenger cascades have been identified, and classified in groups I, II, and III according to their pharmacology and sequence homology [Michaelis, 1998].

Numerous studies have shown that the stimulation of iGluRs and mGluRs in neuronal and non-neuronal cells triggers the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway [Mao et al., 2004; Thomas and Haganir, 2004; Haddad, 2005; Wang et al., 2007]. MAPKs, particularly ERK 1/2, play an important role in proliferation, differentiation and survival processes, as well as in pathological cell migration [López-Colomé and Ortega, 1997; Fukunaga and Miyamoto, 1998; Pearson et al., 2001; Wang et al., 2004; Xu and Deng, 2006].

The Ras-MAPK cascade involves the sequential activation of four signaling proteins: the GTP-binding protein Ras, and the kinases Raf, MEK, and ERK. Receptor and non-receptor

tyrosine kinases, PKC- and Ca^{++} /calmodulin-dependent pathways have been shown to regulate this cascade, through the activation of the small GTPase Ras, the first step in this signaling mechanism [Yoon and Seger, 2006]. Upon the Ras-mediated activation of Raf, which activates the dual function kinase MEK, ERK1/2 phosphorylation on Tyr 204 and Thr 202 by this kinase, leads to the activation of nuclear and cytoplasmic ERK-substrates [Roux and Blenis, 2004]. This process has been shown to play an important role in the control of cell proliferation by the ERK-induced activation of transcription factors NF- κ B, c-Myc, CREB, and AP-1 [Chang et al., 2003], as well as by promoting the expression of regulatory proteins involved in the cell cycle. ERK activation increases the activity of CDKs, such as CDK2, and has also been shown to induce the expression of cyclin D1 via Fos family members, and to regulate the assembly of cyclin E/CDK2 complex [Musgrove, 2006; Chambard et al., 2007]. Also on this line, the activation of p90^{RSK} by ERK1/2 is involved in the regulation of cell cycle through the phosphorylation of substrates such as CREB and Fos [Frödin and Gammeltoft, 1999; Shaulian and Karin, 2002], as well as by the activation of MAPK-interacting kinase MNK1 which in turn phosphorylates the translation initiation factor 4E (eIF4E) [Chambard et al., 2007].

Downstream of ERK1/2, the phosphorylation of cAMP response element-binding protein (CREB) by several stimuli such as growth factors and neurotransmitters turns on the transcription of more than 5,000 target genes, including those coding for cell cycle regulatory proteins such as cyclin D2 and cyclin A1, which regulate G1 to S cell cycle phase transition by activating cyclin-dependent kinase 2 [Siu and Jin, 2007].

Cell proliferation in PVR seems to involve multiple factors [Kaven et al., 2000]. Among these, it is conceivable that RPE cell proliferation and/or epithelial-mesenchymal transition, pivotal processes in the development of PVR, could be directly induced by glutamate through the activation of ERK1/2, the phosphorylation of transcription factors such as CREB and Fos [Vanhouette et al., 1999], and the eventual modification of gene expression. This assumption is supported by findings showing that high concentrations of NMDA induce CREB phosphorylation and

DNA-binding activity of CRE in the retina [Isenoumi et al., 2004], as well as by a more recent study which demonstrates that the specific activation of NMDA receptors stimulates cancer cell division due to the activation of ERK1/2 signaling [Stepulak et al., 2005].

The present study was aimed to analyzing the effect of glutamate on the activation of the ERK1/2 cascade as a possible mechanism involved in the induction of RPE proliferation, using chick RPE cells in primary culture and human-derived ARPE-19 cell line as model systems.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Primary culture of RPE cells was carried out as previously described [López-Colomé et al., 1993]. Eyes from 7-day-old chick embryos were enucleated, the lens and the retina were discarded, and the eye-cups were placed in Krebs-Ringer Bicarbonate buffer (KRB) pH 7.4 containing (in mM): NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.17; KH₂PO₄, 2; NaHCO₃, 25; glucose, 5.6, and rinsed four times. The RPE was dissected and dissociated in Opti-Mem medium (GibcoBRL) following 5 min incubation in phosphate buffered saline, pH 7.4, containing 0.13% trypsin. The cells were plated onto 3.5-cm-diameter multi-well dishes, at a density of 1.2×10^5 cells/well, and incubated at 37°C in Opti-Mem supplemented with 4% fetal bovine serum (FBS), 0.25% Penicillin-Streptomycin-Neomycin, and 0.1% Nistatin. All assays were performed in 5-day-old cultures. Cell morphology was assessed by optic microscopy. The human-derived RPE cell line ARPE-19 (ATCC) was propagated in D-MEM/F12 medium (ATCC) containing 4% FBS, as described previously [Dunn et al., 1996].

Cell-Proliferation

RPE cell proliferation was measured by [³H]-thymidine incorporation. Cells were seeded and maintained for 24 h in medium containing 4% FBS. The medium was then replaced by medium containing 1% FBS in the absence (control), or the presence of glutamate receptor agonists: 1 mM L-glutamic acid; 150 μM aminocyclopentane-1, 3-dicarboxylic acid (ACPD), α-amino-3-hydroxy-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) or N-Methyl-D-aspartic acid (NMDA)

(Tocris). When tested, glutamate receptor antagonists α-Methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG; 50 μM); 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX; 10 μM); dizocilpine maleate (MK-801; 10 μM), and 10 μM of the CaMK inhibitors KN-62 or KN-93 (Tocris) were included 3 h previous to the addition of the agonist. After 24 h, 0.5 μCi/ml [³H]-thymidine (PerkinElmer; 16 Ci/mmol) was added, and cultures were further incubated for 16 h. Following this period, cultures were rinsed twice in PBS and incubated for 1 h with 10% trichloroacetic acid, solubilized in 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), and counted for radioactivity in a liquid scintillation counter (Beckman).

ERK-Stimulation Protocol

Following 4 days in culture in the presence of 4% FBS, cells were serum-deprived for 12 h. One millimolar Glutamate or 150 μM glutamate receptor agonists were then included for 10 min. When tested, glutamate receptor antagonists, the MEK inhibitor PD98059 (30 μM), and the CaMK inhibitors KN-62 and KN-93 (10 μM) as well as the inactive KN-93 analog, KN-92, were included in the medium 3 h prior to the addition of the agonists. At the end of the stimulation period, cells were lysed in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.4, containing 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% Chaps, 0.5% NP40, 0.1% BSA, 10% protease inhibitor cocktail, 40 mM β-glycerophosphate, and 10 mM sodium pyrophosphate.

Immunoprecipitation

The soluble fraction of the lysates was incubated with sepharose-coupled protein-A at 4°C for 1 h. The Protein-A beads were pelleted, and the supernatant was preserved. The beads were incubated at 4°C for 1 h with anti-ERK1/2 polyclonal antibody (Calbiochem; 10 μg/ml), and the immune complex formed was subsequently added to the Protein-A-bead-supernatant and incubated at 4°C for 3 h. Following this period, the samples were washed with lysis buffer and used in ERK activation assays.

ERK1/2 Activation Assay

The ERK immunoprecipitate was washed in Hepes 20 mM, pH 8.0, containing 10 mM MgCl₂,

1 mM DTT, 0.5 mM EGTA, and 40 μ M ATP. Samples were added 5 μ Ci of [γ - 32 P]-ATP (PerkinElmer Life Science; 6000 Ci/mmol), incubated at 37°C for 10 min, washed three times in buffer containing 40 μ M unlabeled ATP, resuspended in Laemmli buffer containing: 0.75 M Tris-HCl pH 8.8, 5% SDS, 20% glycerol, 0.01 bromophenol blue, and boiled for 5 min.

Western Blotting

The samples were resolved by polyacrylamide gel electrophoresis (10%), under denaturing conditions (SDS-PAGE), and electro-transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Amersham Biosciences). After autoradiography, the membranes were incubated in blocking buffer (5% Milk, 2% BSA in Tween TBS) at room temperature for 1 h, followed by further incubation for 1 h in the presence of anti-ERK1/2, 1:5,000. The membranes were washed in Tween TBS, added anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP) antibody (Zymed Laboratories, Inc.) in the same solution, and developed using an enhanced chemiluminescence kit (ECL; Amersham Biosciences). The density of immunoblotted bands was determined using Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad), and normalized to control values. The same protocol was used for anti-p-CREB (Cell Signaling) detection.

RESULTS

The Activation of Ionotropic and Metabotropic Glutamate Receptors Enhances RPE Cell Proliferation

We tested the effect of glutamate on the proliferation of RPE cells in culture, using [3 H]-thymidine incorporation. Our results show a 100% increase in the proliferation of RPE cells maintained in the presence of 1 mM glutamate for 36 h, compared to control cultures. Because chick RPE cells necessarily require serum for survival, proliferation was assessed in the presence of low (1%) FBS (Fig. 1A). In order to rule-out a contribution of serum-contained factors to the observed increase in proliferation, identical experiments were performed in the human-derived RPE cell line ARPE-19 in the complete absence of serum (SFM), since these cells are viable in such condition. The specific glutamate receptor subtypes involved in glutamate-induced proliferation were identified by analyzing the effect of the general Group-I mGluR agonist ACPD, and the ionotropic GluR agonists AMPA and NMDA on proliferation. Results in Figure 1A show that ACPD and NMDA significantly stimulated cell proliferation, whereas AMPA was ineffective. The same experimental protocol was applied to cultures of the human RPE cell line ARPE-19, with similar results (Fig. 1B). This result indicates that NMDA- and metabotropic glutamate

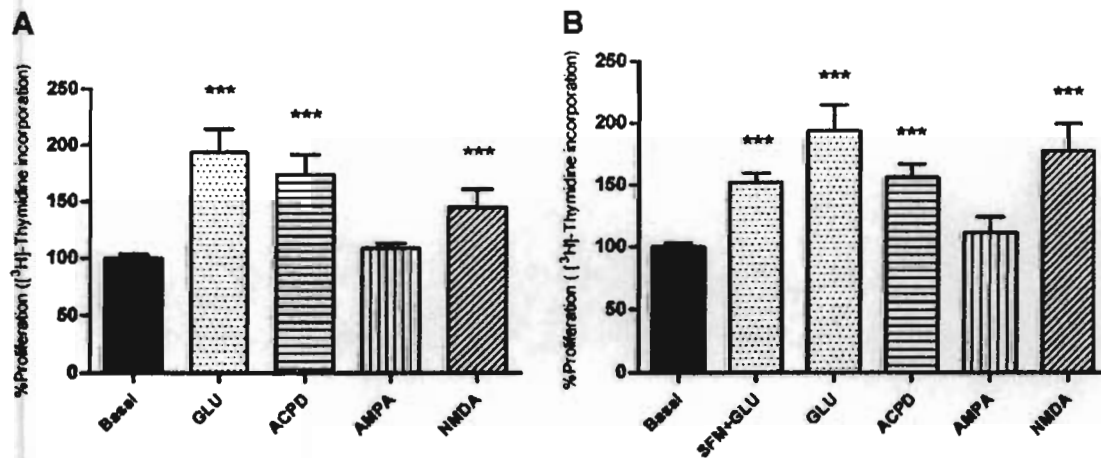


Fig. 1. Effect of glutamate and selective glutamate receptor agonists on RPE cell proliferation. Cells were cultured in the presence of 1.0 mM glutamate or 150 μ M receptor agonists ACPD, AMPA, or NMDA for 24 h, followed by a further 16 h incubation with [3 H]-thymidine. A: Chick RPE; (B) ARPE-19 cell line. Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. *** P < 0.001, Student's t -test, compared to control. C, control; GLU, glutamate; SFM, serum free medium.

receptors are involved in glutamate-induced proliferation.

Glutamate-Induced Proliferation is Prevented by Specific Receptor Antagonists

The relative contribution of selective receptor subtypes to glutamate-induced proliferation was established by testing the effect of specific antagonists on glutamate-induced effect. Figure 2 shows that glutamate-induced proliferation was prevented by the mGluR antagonist MCPG and by the NMDAR open channel blocker MK-801. These results further demonstrate that glutamate stimulates proliferation by activating mainly NMDA- and Group I mGluRs. Unexpectedly, although AMPAR stimulation did not promote proliferation, the specific AMPA/KA receptor antagonist CNQX, prevented glutamate-induced proliferation. In addition to the inhibition of AMPARs, quinoxalines such as CNQX and NBQX have been shown to inhibit non-competitively NMDAR function due to an interaction with the glycine coagonist site of the NMDA receptor [Michaelis, 1998], which could explain this effect.

Glutamate Receptor Activation Stimulates ERK 1/2 Phosphorylation

The MAPK cascades and particularly the ERK1/2 signaling pathway are involved in the

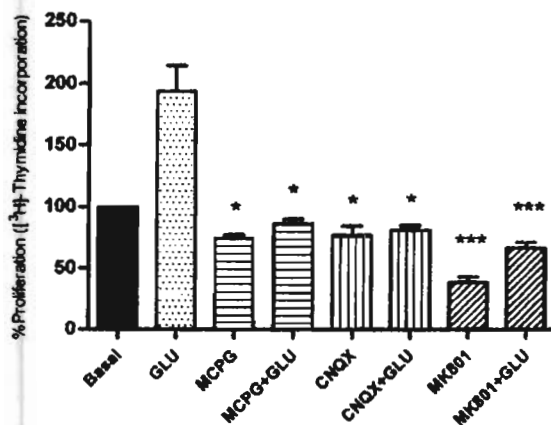


Fig. 2. Glutamate-induced RPE cell proliferation is inhibited by selective antagonists of glutamate receptor subtypes. Experiments were performed as described for Figure 1. Specific glutamate receptor subtype antagonists MCPG (50 μ M), CNQX (10 μ M), and MK-801 (10 μ M) were included 3 h prior to 1.0 mM glutamate. [³H]-thymidine was added 24 h after stimulation and maintained for 16 h. Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. *** P < 0.001, * P < 0.05 Student's t -test, compared to GLU.

control of cell proliferation [Pearson et al., 2001]. We analyzed the effect of glutamate on ERK activation by means of an in vitro kinase-activity assay. Results show that stimulation by 1 mM glutamate transiently increases ERK1/2 phosphorylation in chick RPE and ARPE-19 cells: the response reached maximal value at 10 min, and slowly declined to basal level 30 min after stimulation (not shown). Consistent with the effect of glutamate agonists on proliferation (Fig. 1), results in Figure 3A show that ACPD and NMDA activate ERK 1/2, whereas AMPA has no effect. The mGluR antagonist MCPG and the NMDA open channel blocker MK-801 prevented ERK phosphorylation induced by glutamate (Fig. 3B). This result suggests that glutamate stimulates RPE proliferation through an increase in ERK phosphorylation, mediated by NMDA and Group-I metabotropic receptors. Interestingly, a single phospho-ERK protein band, corresponding to ERK2, was observed in the chick preparation. We hence tested the procedure in ARPE-19 cells in order to rule out a technical problem as the cause for this result. As shown in Figure 3C, the classical p44/p42 doublet was detected in these cells, suggesting a species-related difference in ERK expression.

ERK 1/2 Activation is Required for Glutamate-Induced RPE Cell Proliferation

In order to demonstrate a cause-effect relationship between glutamate-induced ERK phosphorylation and cell proliferation, we analyzed the effect of the MEK1/2 inhibitor PD98059 (30 μ M) on proliferation and ERK activation, since ERK is the only known substrate for the upstream kinase MEK [Pearson et al., 2001]. As shown in Figure 4, whereas proliferation (panel A) and ERK phosphorylation (panel B) induced by mGluR stimulation were prevented by PD98059, the inhibition of MEK did not modify the effect of NMDA on either process (Fig. 4A,B), suggesting that glutamate activates two distinct signaling pathways leading to proliferation, linked to specific receptor subtypes: whereas mGluR stimulation induces proliferation by activating MEK/ERK, NMDAR stimulation promotes proliferation through a different mechanism, likely triggered by intracellular Ca^{++} increase.

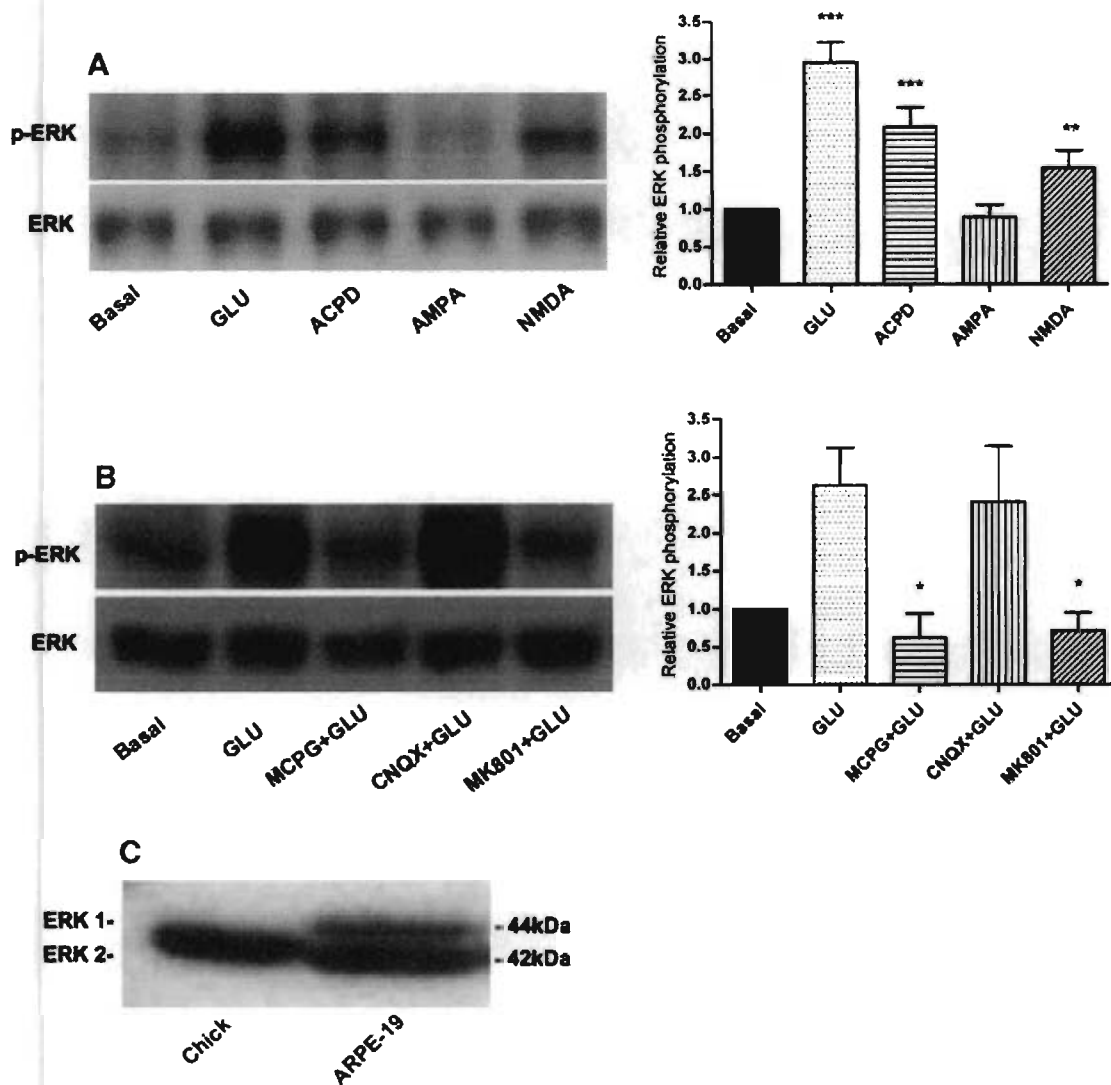


Fig. 3. Stimulation of selective glutamate receptor subtypes activates ERK1/2 in RPE cells. Experiments were performed as described in Methods, and for Figure 1. **A:** Specific glutamate agonists at mGluRs (ACPD) and iGluRs (NMDA and AMPA), differentially increase ERK1/2 phosphorylation. **B:** Stimulation by glutamate shown in (A) is prevented by the antagonists MCPG (mGluR) and MK-801 (NMDAR). The graphs represent the

densitometric analysis of the immunoblots shown on the left. Values are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. **C:** Analysis of ERK 1/2 expression in chick and human-derived ARPE-19 RPE cells shows that ERK1 is not expressed in chick cells. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, Student's *t*-test, (A) referred to control; (B) referred to GLU.

CaMKs are Involved in Glutamate-Induced Proliferation

NMDA-induced ERK phosphorylation in neuronal cells has been shown to require CaMK activity [Illario et al., 2002; Schmitt et al., 2005]. Since NMDA-induced proliferation and ERK phosphorylation were not prevented by the inhibition of MEK (Fig. 4), we tested the effect of the CaMK inhibitors KN-62 and KN-93 on glutamate-, NMDA- and ACPD-induced proliferation and ERK phosphorylation. Results

showed that 10 μ M KN-62 not only prevents agonist-induced proliferation, but decreases proliferation beyond control values (Fig. 5A). As depicted in Figure 5B, ERK activation induced by ACPD was also inhibited by KN-93 suggesting that CaMKs contribute to mGluR/ERK signaling to proliferation. However, although the inhibition of CaMKs suppressed NMDA effect on proliferation (Fig. 5A), KN-93 did not prevent NMDA-induced ERK phosphorylation (Fig. 5B) which indicates that NMDA may stimulate proliferation through a distinct,

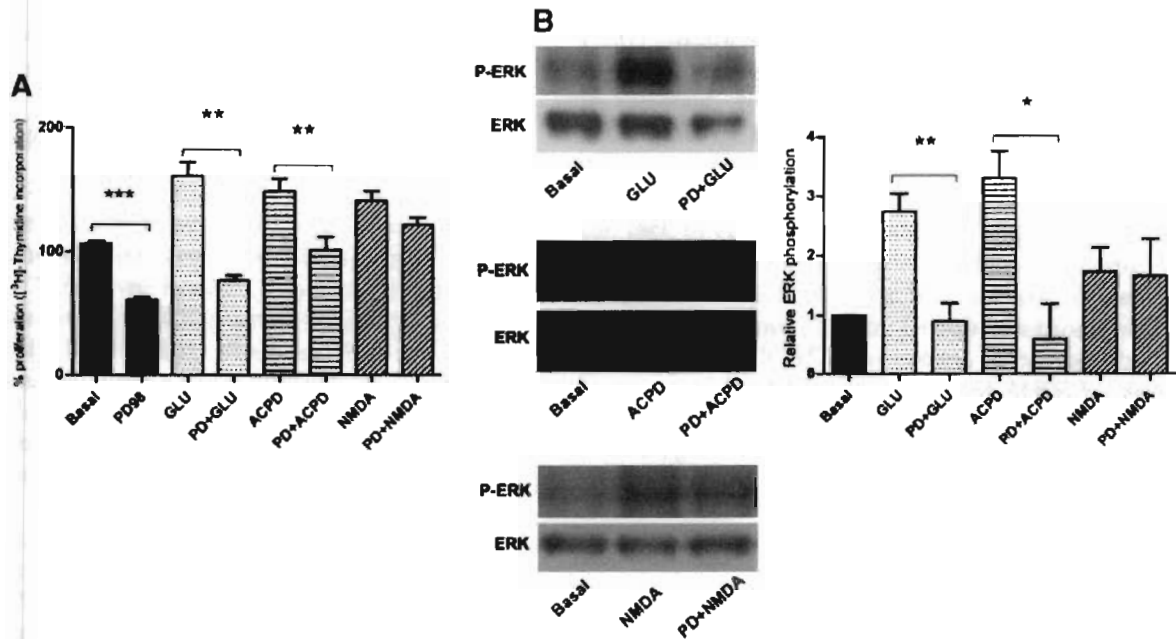


Fig. 4. Glutamate stimulates proliferation through ERK activation. Experiments were performed as described in Methods. **A:** Glutamate- and ACPD-induced cell proliferation is prevented by the MEK inhibitor PD98059 (PD, 30 μ M). **B:** PD98059 prevents ERK phosphorylation induced by mGluR-activation but not by

NMDAR-activation. The graph on B-right depicts the densitometric analysis of the ERK immunoblot on B-left. Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. *** P < 0.001, ** P < 0.01, * P < 0.05, significant difference from control in the absence of the inhibitor, Student's t -test.

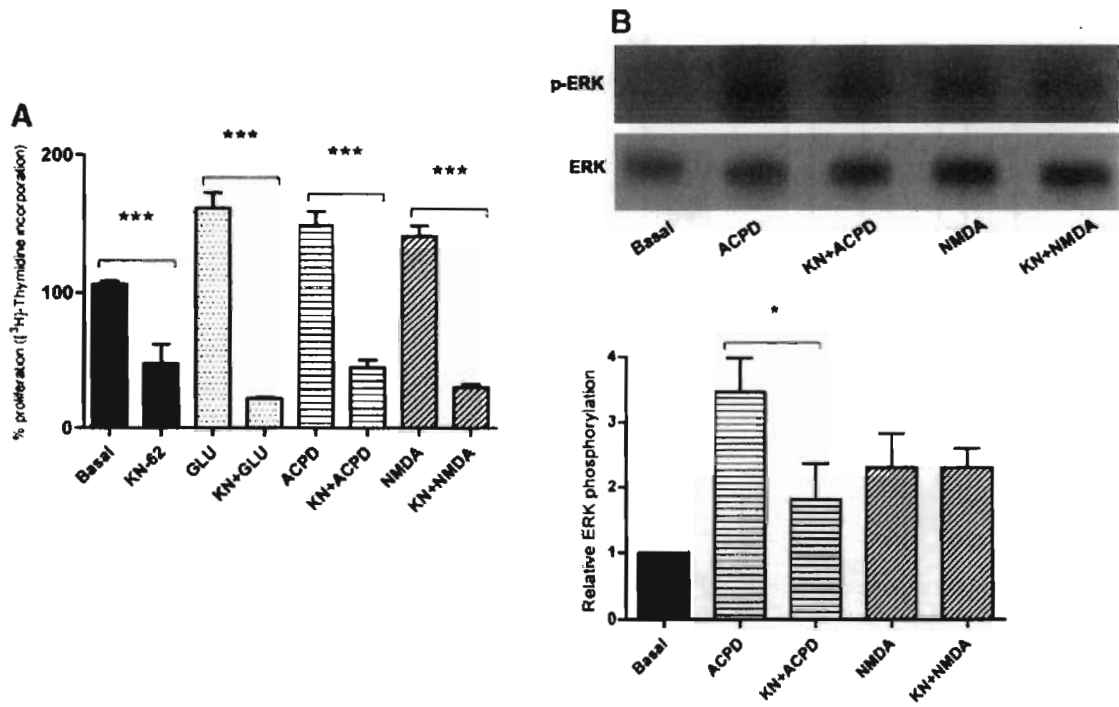


Fig. 5. CaMKs are involved in glutamate stimulation of RPE cell proliferation. Experiments were performed as described in Methods and for Figure 1. ERK activation was measured following 10 min stimulation by 150 μ M ACPD or NMDA. KN-62 or KN-93 was included 3 h prior to agonist-stimulation. **A:** The CaMKs inhibitor KN-62 (KN, 10 μ M) prevents the stimulation of

proliferation induced by the activation of mGluRs (ACPD) and NMDARs. **B:** The CaMKs inhibitor KN-93 (10 μ M) prevents the stimulation of ERK phosphorylation induced by ACPD, but not activation by NMDA. Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. *** P < 0.001, * P < 0.05 Student's t -test, compared to control in the absence of the inhibitor.

MEK-independent signaling mechanism, mediated by CaMKs.

Glutamate Stimulates the Phosphorylation of CREB by ERK1/2

Glutamate stimulation of neuronal receptors has been shown to activate CREB by serine-133 phosphorylation carried by ERK 1/2 [Vanhoutte et al., 1999]; we hence analyzed the effect of glutamate on CREB phosphorylation. Results showed that CREB phosphorylation can be detected as early as 5 min following glutamate stimulation, reaches maximum value after 10 min, and decreases to control level at 30 min (Fig. 6A). This effect was mimicked by ACPD and NMDA, and blocked by the corresponding antagonists MCPG and MK-801, with equivalent potency to that observed for ERK activation (Fig. 6B).

Figure 7A shows that glutamate- and ACPD-induced CREB phosphorylation was prevented by the MEK1/2 inhibitor PD98059. Since

NMDA-induced proliferation or ERK activation were not altered by the inhibition of MEK and, in contrast, NMDA-induced proliferation was prevented by CaMK inhibition, we tested the effect of KN-62 on NMDA-induced CREB phosphorylation; results in Figure 7B show the lack of effect of the CaMK inhibitor. These results further support that glutamate stimulates RPE cell proliferation by activating different pathways mediated by Group I metabotropic receptors and NMDA receptors. Whereas the former involves the activation of MEK/ERK/CREB, the later requires the activity of CaMKs, and does not relate to the phosphorylation of ERK by MEK.

DISCUSSION

Numerous factors seem to be involved in the proliferation and transformation of RPE cells observed in PVR [Holtkamp et al., 2001; Hecquet et al., 2002]. Although glutamate

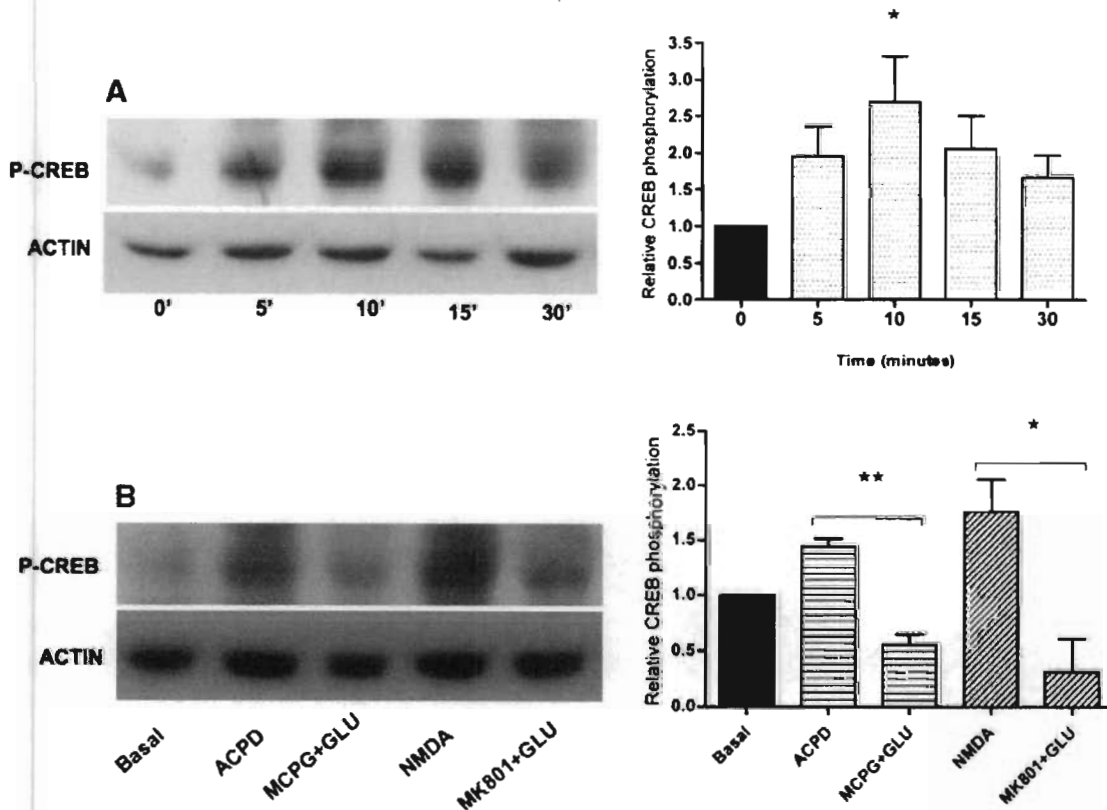


Fig. 6. Stimulation of metabotropic- and NMDA receptors induces the time-dependent activation of CREB. Experiments were performed as described in Methods. A: Glutamate (1 mM) stimulates CREB phosphorylation in a time-dependent manner. B: Glutamate-induced CREB activation is inhibited by the

receptor inhibitors MCPG (mGluRs) and MK-801 (NMDARs). The graphs on the right depict the densitometric analysis of the blots on the left, normalized to actin. Results are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, Student's *t*-test.

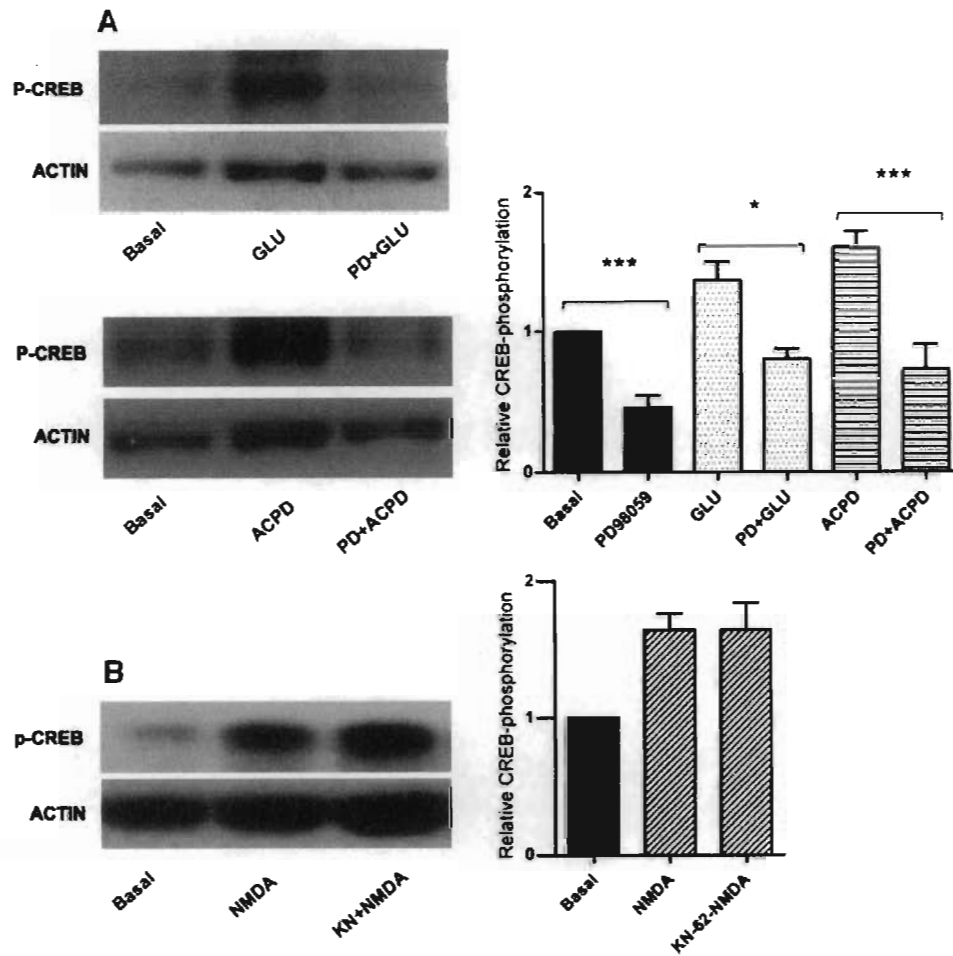


Fig. 7. Glutamate induces CREB phosphorylation by activating the MEK/ERK pathway. Experiments were performed as described in Methods. **A:** The MEK inhibitor PD98059 (30 μ M) was included in the medium 3 h prior to the addition of the agonists. The graph on the right corresponds to the densitometric

analysis of the immunoblots shown on the left, normalized to actin. **B:** KN-62 fails to inhibit the NMDA-induced CREB phosphorylation. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments. *** $P < 0.001$; * $P < 0.05$, Student's *t*-test.

concentration in PVR tissue has not been determined, an increase in glutamate levels in the vitreous cavity of patients has been observed following retinal detachment and hypoxia [Diederer et al., 2006]. Such increase could be due to the decrease in the expression of the transporter proteins responsible for its clearance [Lewis et al., 1989; Li and Puro, 2002; Gadea et al., 2004] in retinal glia, a core component of PVR epiretinal membranes, which have also been shown to release glutamate in response to receptor-induced osmotic stress [Takano et al., 2005]. Additionally, upon retinal detachment or surgical damage to the BRB, glutamate from serum (100–300 μ M), or from damaged retinal cells which contain millimolar glutamate concentrations, may reach the RPE [Castillo et al., 1997]. Hence, under

pathologic conditions *in vivo*, elevation of glutamate could contribute to the development of PVR through the activation of specific receptors on RPE cells.

The stimulation of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in neurons has been shown to activate the PKC-, PI3-K-, and Ca⁺⁺/calmodulin-dependent Ras/Raf/MEK/ERK cascade [Wang et al., 2007], known to participate in the regulation of proliferation, differentiation and survival processes [López-Colomé and Ortega, 1997; Pearson et al., 2001; Thomas and Huganir, 2004; Wang et al., 2004]. In RPE, although a previous report showed an indirect effect of glutamate on RPE proliferation [Uchida et al., 1998], and results from Hecquet et al. [2002] have shown the involvement of the Ras/Raf/MEK/ERK MAPK pathway in

serum-induced RPE proliferation, neither the activation of this pathway by glutamate, nor the increase in proliferation induced by such activity has been previously established in RPE.

We demonstrated here that glutamate increases the proliferation of chick RPE and human-derived ARPE-19 cells by activating two signaling pathways linked to NMDARs and Group I mGluRs, since this effect was prevented by the receptor-specific inhibitors MK-801 and MCPG, respectively. Whereas the effect of mGluR stimulation by glutamate and ACPD on proliferation was prevented by the MEK inhibitor PD98059, indicating the participation of the MEK/ERK1/2 pathway (Fig. 4), NMDAR-induced proliferation was prevented by the CaMK inhibitor KN-62, but not by PD98059, suggesting the activation by CaMKs of an alternate pathway leading to proliferation, independent from MEK/ERK.

In order to support this conclusion, we measured the effect of NMDAR- and mGluR stimulation on the activation of ERK1/2. Although ACPD and NMDA were shown to increase the level of phosphorylated ERK to similar extent, ACPD-induced effect was prevented by PD98059, suggesting ERK activation by MEK, whereas the NMDA-induced increase in phosphorylated ERK was not modified by PD98059 or by KN-93.

The lack of effect of PD98059 and KN-93 on NMDA-induced ERK phosphorylation rules out the activation of the MEK/ERK pathway [Vanhoutte et al., 1999] and suggests that the elevation of phosphorylated ERK might, alternatively, derive from decreased dephosphorylation due to the inactivation of MAPK phosphatases by the inhibition of a CaMK-mediated activating mechanism [Bito et al., 1996; Lin and Yang, 2006]. Together with the inhibition of NMDA-induced activation of ERK by MK-801, the failure of PD98059 to inhibit NMDA effect rules-out the possible activation of Tyrosine Kinase receptors by neurotrophins such as BDNF, PDGF, or FGF [Uchida et al., 1998], which could be released by Ca^{2+} entry through NMDARs, as a possible cause of this effect.

We showed that, in addition to PD98059, the activation of ERK by mGluRs was also decreased by KN93, which may be due to the activation of PLC, the formation of IP3 [Fragoso and López-Colomé, 1999], the increase in cytoplasmic calcium, and the subsequent acti-

vation of CaMKs. Together these results demonstrate that although the induction of cell proliferation by mGluR activation is mainly achieved through the MEK/ERK pathway, the activation of CaMKs contributes to this effect.

On this matter, a role for CaMKs in the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway has been documented, although the precise CaMKs involved are not clearly defined. CaMKII has been suggested to play an important role in the activation of ERK by NMDA receptors in striatal neurons, through the activation of Ras [Vanhoutte et al., 1999; Choe and Wang, 2001], and also to modulate proliferation mediated by this pathway by activating the upstream kinase Raf-1 [Illario et al., 2002]. In addition, the possible contribution of CaMKK and CaMKI and of PI3K to ERK phosphorylation in our system cannot be excluded, since the activation of CaMKI by CaMKK in neuronal cells has been shown to mediate depolarization- and NMDA-induced ERK activation [Soderling and Stull, 2001; Uezu et al., 2002; Schmitt et al., 2004]. Furthermore, the phosphorylation of ERK by NMDAR activation during E-LTP was shown to require CaMKK acting through CaMKI [Schmitt et al., 2005]. Likewise, recent reports have also suggested the activation of ERK1/2 signaling pathway by a PI3 kinase-dependent mechanism [Agell et al., 2002; Perkinson et al., 2002].

In order to determine the downstream target of activated ERK, the effect of glutamate and ACPD on CREB phosphorylation was first analyzed. In agreement with previous work showing that, among multiple factors, MAPK cascade activates CREB [Xing et al., 1996], a fast and transient activation of CREB in correlation with the time-course of ERK activation was observed, which was inhibited by PD98059 (Fig. 7A), indicating that mGluR-induced CREB phosphorylation results from MEK-induced ERK activation.

Since the effect of NMDAR-stimulation on proliferation and ERK phosphorylation was not modified by PD98059, we next tested the effect of KN-62, which inhibited NMDA-induced proliferation, on NMDA-induced CREB activation and found that NMDA-induced CREB activation was not modified by this agent. Although further investigation is required to support this notion, a possible explanation for this result could be the inhibition of calcineurin, a Ca^{++} /CaM-dependent Ser/Thr phosphatase shown

to dephosphorylate CREB at Ser 133, by the KN-62 inhibition of CaMKs [Shaywitz and Greenberg, 1999].

Intracellular calcium increase activates numerous, often opposing signaling pathways. These multiple actions depend, among other factors, on the route of calcium entry [Shaywitz and Greenberg, 1999]. In neurons, calcium influx through synaptic NMDARs activates two key signaling pathways, both of which lead to CREB phosphorylation on Ser133: the Ras-ERK1/2 pathway and the nuclear CaMK pathway, probably involving CaM kinase IV [Agell et al., 2002]. CaMK IV is calcium-dependent, whereas ERK1/2 and RSK2 are not, and consequently are activated more slowly than CaMKs and their activity is sustained. Thus, although the CaMK pathway activates CREB within the first few seconds of Ca^{++} influx, the recruitment of ERK1/2 pathway is needed to prolong CREB phosphorylation after activity has ceased, which is important for robust activation of CREB-dependent gene expression, which possibly requires the activation of CBP by CaMK IV phosphorylation of Ser301 [Deisseroth et al., 1998; Hardingham and Bading, 2003].

In our model, the increase in phosphorylated CREB either by MEK/ERK activation (mGluR), or by decreased ERK dephosphorylation (NMDAR), could promote the expression of genes involved in cell cycle progression [Chang et al., 2003; Roux and Blenis, 2004], thus stimulating proliferation. Furthermore, an increase in cyclin D1 expression due to ERK activation has been recently shown to increase the proliferation of RPE cells induced by serum [Hecquet et al., 2002]. The fact that KN-62 did not inhibit CREB phosphorylation induced by either receptor further indicates that CaMKs participate in glutamate receptor-induced cell proliferation at a step downstream of CREB, consistent with an action on cell cycle regulation.

We found that stimulation of proliferation by ACPD (mGluR) was inhibited by PD98059, whereas that induced by NMDA was not, however, the effect of both agonists on proliferation was completely blocked by KN-62, suggesting that, in addition to the possible activation of Ras by CaMKs due to calcium increase driven by mGluRs, CaMKs also participate in the regulation of proliferation induced by both receptor subtypes at a level

downstream of CREB, possibly the regulation of cell cycle.

The Ca^{++} /CaM-dependent pathways which regulate progression through cell cycle transitions remain ambiguous however, the transcriptional activation of specific genes involved in this process requires CaMKs activity [Kahl and Means, 2003]. The induction of proliferation requires, particularly, the expression of cyclins which control cell cycle progression by interacting with- and activating cyclin-dependent kinases (CDKs). Our results showing that KN-62 not only inhibits mGluR-induced proliferation, but further decreases the basal (control) proliferation rate of RPE cells (Fig. 5A), are in agreement with previous reports showing that KN-93 prevents G1 cell cycle phase progression in both, normal and

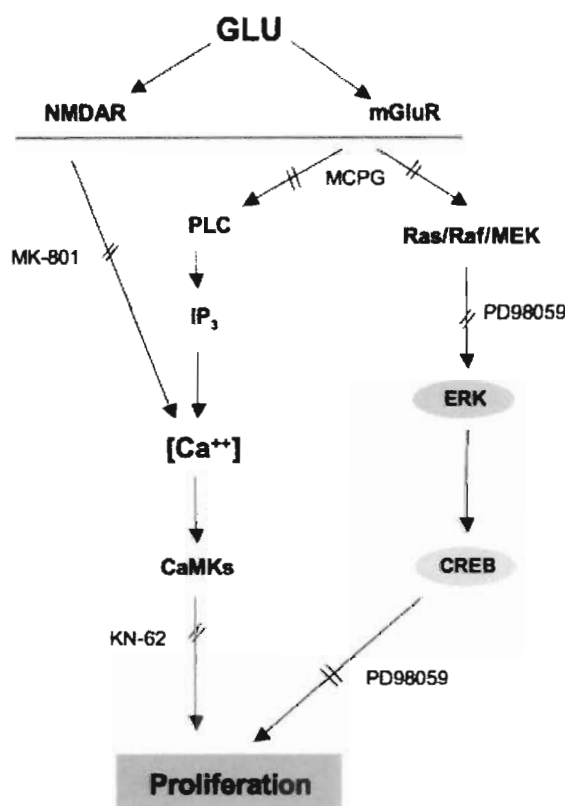


Fig. 8. Schematic of GluR-mediated stimulation of RPE cell proliferation. The activation of mGluRs and ionotropic NMDARs by increased extracellular glutamate stimulates cell proliferation by activating distinct signaling pathways. The inhibition of MEK prevents mGluR- but not NMDAR-mediated stimulation of proliferation. Inhibition of CaMKs prevents the increase in proliferation induced by both, mGluR and NMDAR stimulation, suggesting the concurrence of these pathways downstream of CREB, possibly at the regulation of cell cycle progression (see Discussion).

transformed cells [Kahl and Means, 2003; Choi and Husain, 2006]. This possibility would also explain the inhibition of NMDA-induced proliferation by KN-62, due to the NMDA-mediated calcium increase and the consequent activation of CaMKs. Although KN-62 is suggested to be CaMKII-specific, KN-62 actually inhibits CaMKI and CaMKII with similar efficacy [Hidaka and Yokokura, 1996], and CaMKI, rather than CaMKII has been proposed to regulate the progression of G1 phase of the cell cycle [Kahl and Means, 2003].

The present findings demonstrate that glutamate activates two parallel pathways leading to ERK1/2 and CREB phosphorylation in RPE cells by acting on metabotropic (Group I) and NMDA receptor subtypes, and also show that the independent stimulation of both pathways increases RPE cell proliferation (Fig. 8). These results thus suggest that under pathological conditions or surgical procedures in which the BRB is compromised, the elevation of extracellular glutamate may be involved in the alteration of gene expression leading to the long term increase in RPE cell proliferation, as observed in PVR.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the excellent technical assistance of José Prisco Palma. This work was partially supported by Grants 42640-Q from CONACYT and IN228203 from PAPIIT/UNAM to A.M.L.-C.

REFERENCES

- Abe T, Durlu YK, Tamai M. 1996. The properties of retinal pigment epithelial cells in proliferative vitreoretinopathy compared with cultured retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 63:201–210.
- Agell N, Bacha O, Rocamora N, Villalonga P. 2002. Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca^{2+} , and calmodulin. *Cell Signal* 14:649–654.
- Ando A, Ueda M, Uyama M, Masu Y, Ito S. 2000. Enhancement of dedifferentiation and myoid differentiation of retinal pigment epithelial cells by platelet derived growth factor. *Br J Ophthalmol* 84:1306–1311.
- Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. 1996. CREB Phosphorylation and dephosphorylation: A Ca^{2+} - and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87:1203–1214.
- Bryckaert M, Guillonneau X, Hecquet C, Perani P, Courtois Y, Mascarelli F. 2000. Regulation of proliferation-survival decisions is controlled by FGF1 secretion in retinal pigmented epithelial cells. *Oncogene* 19:4917–4929.
- Casaroli-Marano RP, Pagan R, Vilaro S. 1999. Epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy: Intermediate filament protein expression in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2062–2072.
- Castillo J, Davalos A, Noya M. 1997. Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet* 349:79–83.
- Chambard JC, Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P. 2007. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* 1773:1299–1310.
- Chang F, Steelman LS, Shelton JG, Lee JT, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin R, McCubrey JA. 2003. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol* 22:469–480.
- Choe ES, Wang JQ. 2001. Group I metabotropic glutamate receptors control phosphorylation of CREB, Elk-1 and ERK via a CaMKII-dependent pathway in rat striatum. *Neurosci Lett* 313:129–132.
- Choi J, Husain M. 2006. Calmodulin-mediated cell cycle regulation. *Cell Cycle* 5:2183–2186.
- Deisseroth K, Heist EK, Tsien RW. 1998. Calmodulin translocation to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* 392:198–202.
- Diederer RM, La Heij EC, Deutz NE, Kijlstra A, Kessels AG, van Eijk HM, Liem AT, Dieudonne S, Hendrikse F. 2006. Increased glutamate levels in the vitreous of patients with retinal detachment. *Exp Eye Res* 83:45–50.
- Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. 1996. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res* 62:155–169.
- Fragoso G, López-Colomé AM. 1999. Excitatory amino acid-induced inositol phosphate formation in cultured retinal pigment epithelium. *Vis Neurosci* 16:263–269.
- Frödin M, Gammeltoft S. 1999. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 151:65–77.
- Fukunaga K, Miyamoto E. 1998. Role of MAP kinase in neurons. *Mol Neurobiol* 16:79–95.
- Gadea A, Lopez E, López-Colomé AM. 2004. Glutamate-induced inhibition of D-aspartate uptake in Muller glia from the retina. *Neurochem Res* 29:295–304.
- Grisanti S, Guidry C. 1995. Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:391–405.
- Guerrini L, Blasi F, Denis-Donini S. 1995. Synaptic activation of NF-kappa B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9077–9081.
- Haddad JJ. 2005. N-methyl-D-aspartate (NMDA) and the regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways: A revolving neurochemical axis for therapeutic intervention? *Prog Neurobiol* 77:252–282.
- Hardingham GE, Bading H. 2003. The Yin and Yang of NMDA receptor signaling. *Trends Neurosci* 26:81–89.
- Hecquet C, Lefevre G, Valtink M, Engelmann K, Mascarelli F. 2002. Activation and role of MAP kinase-dependent pathways in retinal pigment epithelial cells: ERK and RPE cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3091–3098.
- Hidaka H, Yokokura H. 1996. Molecular and cellular pharmacology of a calcium/calmodulin-dependent protein

- kinase II (CaM kinase II) inhibitor, KN-62, and proposal of CaM kinase phosphorylation cascades. *Adv Pharmacol* 36:193–219.
- Holtkamp GM, Kijlstra A, Peek R, de Vos AF. 2001. Retinal pigment epithelium-immune system interactions: Cytokine production and cytokine-induced changes. *Prog Retin Eye Res* 20:29–48.
- Illario M, Cavallo AL, Bayer KU, Di Matola T, Fenzi G, Rossi G, Vitale M. 2002. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II binds to Raf-1 and modulates integrin-stimulated ERK activation. *J Biol Chem* 278:45101–45108.
- Izenoumi K, Kumai T, Kitaoka Y, Motoki M, Kitaoka Y, Kuribayashi K, Munemas Y, Kogo J, Kobayashi S, Ueno S. 2004. N-Methyl-D-aspartate induces phosphorylation of cAMP response element (CRE)-binding protein and increases DNA-binding activity of CRE in rat retina. *J Pharmacol Sci* 95:108–114.
- Kahl CR, Means A. 2003. Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev* 24:719–736.
- Kaven CW, Spraul CW, Zavazava NK, Lang GK, Lang GE. 2000. Growth factor combinations modulate human retinal pigment epithelial cell proliferation. *Curr Eye Res* 20:480–487.
- Komuro H, Rakic P. 1993. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260:95–97.
- Lewis GP, Erickson PA, Guerin CJ, Anderson DH, Fisher SK. 1989. Changes in the expression of specific Muller cell proteins during long-term retinal detachment. *Exp Eye Res* 49:93–111.
- Li Q, Puro DG. 2002. Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3109–3116.
- Limb GA, Little BC, Meager A, Ogilvie JA, Wolstencroft RA, Franks WA, Chignell AH, Dumonde DC. 1991. Cytokines in proliferative vitreoretinopathy. *Eye* 5(Pt 6):686–693.
- Lin Y-W, Yang J-L. 2006. Cooperation of ERK and SCF^{Skp2} for MKP-1 destruction provides a positive feedback regulation of proliferation signaling. *J Biol Chem* 281:915–926.
- López-Colomé AM, Ortega A. 1997. Activation of p42 mitogen-activated protein kinase by glutamate in cultured radial glia. *Neurochem Res* 22:679–685.
- López-Colomé AM, Salceda R, Fragoso G. 1993. Specific interaction of glutamate with membranes from cultured retinal pigment epithelium. *J Neurosci Res* 34:454–461.
- López-Colomé AM, Fragoso G, Wright CE, Sturman JA. 1994. Excitatory amino acid receptors in membranes from cultured human retinal pigment epithelium. *Curr Eye Res* 13:553–560.
- Mao L, Tang Q, Samdani S, Liu Z, Wang JQ. 2004. Regulation of MAPK/ERK phosphorylation via ionotropic glutamate receptors in cultured rat striatal neurons. *Eur J Neurosci* 19:1207–1216.
- Massey SC, Miller RF. 1990. N-methyl-D-aspartate receptors of ganglion cells in rabbit retina. *J Neurophysiol* 63:16–30.
- Michaelis EK. 1998. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54:369–415.
- Musgrove EA. 2006. Cyclins: Roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation. *Growth Factors* 24:13–19.
- Pastor JC, de la Rúa ER, Martin F. 2002. Proliferative vitreoretinopathy: Risk factors and pathobiology. *Prog Retin Eye Res* 21:127–144.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22:153–183.
- Perkinton MS, Ip JK, Wood GL, Crossthwaite AJ, Williams RJ. 2002. Phosphatidylinositol 3-kinase is a central mediator of NMDA receptor signalling to MAP kinase (Erk1/2), Akt/PKB and CREB in striatal neurones. *J Neurochem* 80:239–254.
- Roux PP, Blenis J. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: A family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:320–344.
- Schmitt JM, Wayman GA, Nozaki N, Soderling TR. 2004. Calcium activation of ERK mediated by calmodulin kinase I. *J Biol Chem* 279:24064–24072.
- Schmitt JM, Gire ES, Saneyoshi T, Soderling TR. 2005. Calmodulin-dependent kinase/calmodulin kinase I activity gates extracellular-regulated kinase-dependent long-term potentiation. *J Neurosci* 25:1281–1290.
- Shaulian E, Karin M. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4:E131–E136.
- Shaywitz AJ, Greenberg ME. 1999. CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68:821–861.
- Siu YT, Jin DY. 2007. CREB-areal culprit in oncogenesis. *FEBS J* 274:3224–3232.
- Soderling TR, Stull JT. 2001. Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *Chem Rev* 101:2341–2352.
- Stepulak A, Sifringer M, Rzeski W, Endesfelder S, Gratopp A, Pohl EE, Bittigau P, Felderhoff-Mueser U, Kaundl AM, Buhner C, Hansen HH, Stryjecka-Zimmer M, Turski L, Ikonomidou C. 2005. NMDA antagonist inhibits the extracellular signal-regulated kinase pathway and suppresses cancer growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:15605–15610.
- Strauss O. 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85:845–881.
- Takano T, Kang J, Jaiswal JK, Simon SM, Lin JH, Yu Y, Li Y, Yang J, Dienel G, Zielke HR, Nedergaard M. 2005. Receptor-mediated glutamate release from volume sensitive channels in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16466–16471.
- Thomas GM, Haganir RL. 2004. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:173–183.
- Uchida N, Kiuchi Y, Miyamoto K, Uchida J, Tobe T, Tomita M, Shioda S, Nakai Y, Koide R, Oguchi K. 1998. Glutamate-stimulated proliferation of rat retinal pigment epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 343:265–273.
- Uezu A, Fukunaga K, Kasahara J, Miyamoto E. 2002. Activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 82:585–593.
- Vanhoutte P, Barnier JV, Guibert B, Pages C, Besson MJ, Hipskind RA, Caboche J. 1999. Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices. *Mol Cell Biol* 19:136–146.

- Wang JQ, Tang Q, Parelkar NK, Liu Z, Samdani S, Choe ES, Yang L, Mao L. 2004. Glutamate signaling to Ras-MAPK in striatal neurons: Mechanisms for inducible gene expression and plasticity. *Mol Neurobiol* 29:1–14.
- Wang JQ, Fibuch EE, Mao L. 2007. Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *J Neurochem* 100:1–11.
- Xing J, Ginty DD, Greenberg ME. 1996. Coupling of the ras-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth-factor-regulated CREB kinase. *Science* 273:959–963.
- Xu L, Deng X. 2006. Suppression of cancer cell migration and invasion by protein phosphatase 2A through dephosphorylation of mu- and m-calpains. *J Biol Chem* 281:35567–35575.
- Yoon S, Seger R. 2006. The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24:21–44.