



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE
LOS RECEPTORES PARA NMDA EN EL DESARROLLO
DE LA RETINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
PRESENTA LA M. EN C.
I R E N E L E E R I V E R A

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA MA. LÓPEZ COLOMÉ
COMITÉ TUTORAL: DR. JULIO MORAN ANDRADE
DR. MIGUEL MORALES MENDOZA

CIUDAD UNIVERSITARIA,

NOVIEMBRE, 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR
Doctorado en Ciencias Biomédicas

**Caracterización del Perfil de Expresión de los
Receptores para NMDA en el Desarrollo de la Retina**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
Presenta la M. en C.**

IRENE LEE RIVERA

Directora de Tesis: Dra. Ana Ma. López Colomé

Comité Tutorial:

Dr. Julio Morán Andrade

Dr. Miguel Morales Mendoza

Ciudad Universitaria, Noviembre, 2004

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana María López Colomé, por brindarme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, por su apoyo incondicional en los momentos difíciles, y por toda la paciencia y dedicación invertidas en mi formación profesional.

Al Dr. Angel Zarain Herzberg, por todas las horas de discusión que me ayudaron a superar las dificultades técnicas que encontré en el camino.

A los miembros del Comité Tutorial los Doctores Julio Morán Andrade, Miguel Morales Mendoza por participar en mi formación durante el Doctorado.

A los miembros del jurado los Doctores Ana María López Colomé, Julio Morán Andrade, Lourdes Massieu Trigo, Gabriel Gutierrez Ospina, José Segovia Vila, Rocío Salceda Scanelles y Angel Zarain Herzberg, por sus valiosos comentarios y correcciones en la elaboración de esta tesis.

A Edith López Hernández y Gabriela Rodríguez Rodríguez, por su excelente ayuda técnica.

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 (proyectos 31812-N y 42640-Q), y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación en Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM, proyecto IN-228203). Además, se contó con un donativo del Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM 2004, proyecto 202330) otorgado a Irene Lee Rivera.

El comité tutorial estuvo conformado por los Doctores Julio Morán Andrade, Miguel Morales Mendoza y Ana María López Colomé.

El Jurado del Examen de Grado estuvo conformado por los Doctores Ana María López Colomé, Julio Morán Andrade, Lourdes Massieu Trigo, Gabriel Gutierrez Ospina, José Segovia Vila, Rocío Salceda Scanelles y Angel Zarain Herzberg.

INDICE

Abreviaturas	4
Resumen	6
Abstract	8
I. Introducción	10
<i>Los receptores de glutamato y su clasificación</i>	10
<i>Receptores de Glutamato de tipo Metabotrópico</i>	12
Grupo 1	12
Grupo 2	13
Grupo 3	13
<i>Receptores de Glutamato de tipo Ionotrópico</i>	14
Receptores de tipo no-NMDA	16
Receptores de tipo NMDA	18
<i>Estructura de los receptores de tipo NMDA</i>	20
Estructura de la subunidad NR1	20
Estructura de las subunidades NR2	22
<i>Localización de los NMDARs en la membrana sináptica</i>	24
<i>Neurotransmisión excitadora en la retina</i>	27
Morfología de la retina	27
Desarrollo de la retina	32
Fisiología de la retina	35
<i>Los receptores de tipo NMDA en la neurotransmisión excitadora en la retina</i>	37
Expresión de subunidades de los NMDARs en la retina	38
<i>El papel de los NMDARs en la maduración de los circuitos sinápticos de la retina</i>	40
<i>El papel del NMDAR en condiciones patológicas de la retina</i>	44
II. Objetivos	47
III. Metodología	49
Extracción de RNA	49
Diseño de cebadores ("primers")	49
Análisis de los transcritos de NR1 y NR2 por RT-PCR	50
Análisis Estadístico	51
Análisis de la secuencia de los productos de RT-PCR	51

Análisis de las Isoformas de NR1 por Western Blot	52
IV. Resultados	54
<i>I. Expresión de NR1</i>	<i>54</i>
1. Expresión general de las variantes de NR1	54
Análisis comparativo entre la retina diferenciada y el cerebro	54
Análisis del perfil de expresión de NR1 en el desarrollo embrionario de la retina	54
2. Expresión de las isoformas de NR1 por empalme alternativo del exón 5	56
Análisis comparativo entre la retina diferenciada y el cerebro	56
Análisis del perfil de expresión de NR1 que contienen exon 5 en el desarrollo embrionario de la retina	58
3. Expresión de las variantes de NR1 en el extremo C-terminal en la retina y en el cerebro	58
Análisis de las variantes por empalme alternativo del casete C1	58
Análisis de las variantes por empalme alternativo de los casetes C2 y C3	58
Análisis comparativo de la expresión de las variantes por empalme del extremo C-terminal en el desarrollo embrionario de la retina	63
4. Expresión de la proteína NR1	63
<i>II. Expresión de NR2</i>	<i>65</i>
1. Expresión de NR2A	65
Análisis comparativo entre la retina diferenciada y el cerebro	65
Análisis del perfil de expresión de NR2A en el desarrollo embrionario de la retina	65
2. Expresión de NR2B	67
Análisis comparativo entre la retina diferenciada y el cerebro	67
Análisis del perfil de expresión de NR2B en el desarrollo embrionario de la retina	67
3. Expresión de NR2C	69
Análisis comparativo entre la retina diferenciada y el cerebro	69
Análisis del perfil de expresión de NR2C en el desarrollo embrionario de la retina	69
4. Expresión de NR2D	71
Análisis comparativo entre la retina diferenciada y el cerebro	71
Análisis del perfil de expresión de NR2D en el desarrollo embrionario de la retina	71

V. Discusión	73
<i>I. Expresión de las subunidades del NMDAR en la retina diferenciada</i>	<i>73</i>
A. Expresión de NR1 en la retina diferenciada	73
1. Variantes de NR1 en la región N-terminal	73
2. Variantes por empalme del extremo C-terminal de NR1	75
Análisis del casete C1	75
Análisis del casete C2/C2'	75
Análisis del casete C3	76
B. Expresión de NR2 en la retina diferenciada	77
1. Expresión de NR2A	77
2. Expresión de NR2B	78
3. Expresión de NR2C	79
4. Expresión de NR2D	80
<i>II. Expresión de las subunidades del NMDAR durante el desarrollo embrionario de la retina</i>	<i>81</i>
A. Expresión de la subunidad NR1 durante el desarrollo embrionario	82
1. Variantes del extremo N-terminal de NR1	82
2. Variantes de NR1 en el extremo C-terminal	83
B. Expresión de NR2 en el desarrollo embrionario de de la retina	84
1. Expresión de NR2A y NR2B	84
2. Expresión de NR2C y NR2D	85
VI. Conclusiones	87
VII. Relevancia	89
VII. Bibliografía	91
VIII. Artículo	107

ABREVIATURAS

1S,3R-ACPD	Ácido (\pm)-1-Aminocyclopentano-trans-1,3-dicarboxílico
7-CK	Ácido 7-clorokinurénico
ABP	Proteína que une F-actina
AC	Adenilil ciclasa
ACEA-1021	5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalina-2,3-diona
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
APV	2-amino-5-fosfonovalerato
CaMKII	Cinasa II dependiente de Ca^{++} /calmodulina
CPP	Ácido 3-(+)-2-carboxipiperazin-4-yl)-propil-1-fosfónico
DAG	Diacil-glicerol
DE	Desarrollo embrionario
DHPG	Dihidroxi-fenilglicina
DSGC	Células ganglionares sensibles al movimiento
E8, E10, E13, E17	Embrión de pollo de 8, 10, 13, y 17 días
EPR	Epitelio pigmentado de la retina
FABP	Proteína que une ácidos grasos
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GCL	Capa de células ganglionares
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
GRIP	Proteína que interacciona con receptores de glutamato
iGluRs	Receptores ionotrópicos de glutamato
INL	Capa nuclear interna
IP3	Inositol 1-4-5 trifosfato
IPL	Capa plexiforme interna
KA	Ácido kainico
LAOBP	Proteína que une lisina, arginina y ornitina
L-AP4	L-2-amino-4-fosfonobutirato
L-CCG	L-2-(carboxiciclopropil)-glicina-l

LTD	Depresión a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
LVSCC	Canales de Ca ⁺⁺ sensibles a voltaje tipo L
MAGUKs	Guanilil cinasas asociadas a la membrana
mGluRs	Receptores metabotrópicos de glutamato
MK-801	(+) 5-metil-10-11 dihidro-5H dibenzo (a,d) ciclohepten-5-10-imina)
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NMDAR	Receptor de N-metil-D-Aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintasa del óxido nítrico
O₂⁻	Ión superóxido
ONOO⁻	Peroxinitrito
OPL	Capa plexiforme externa
ORF	Marco de lectura abierto
PCR	Reacción en cadena de la DNA polimerasa
PICK1	proteína que une PKC
PIP2	Fosfatidilinositol-4-5-difosfato
PKA	Proteína Cinasa A
PKC	Proteína Cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PSD	Densidad postsináptica
QA	Quisqualato
QBP	Proteína que une glutamina
RE	Retículo endoplásmico
RGCs	Células ganglionares
RT	Transcripción reversa
SNC	Sistema Nervioso Central

Resumen

El glutamato es el neurotransmisor excitador en la vía vertical de la retina de los vertebrados. Interactúa con receptores ionotrópicos de tipo AMPA/KA y NMDA, así como con receptores de tipo metabotrópico acoplados a proteínas G. Los receptores NMDA (NMDARs) son proteínas tetraméricas formadas por las subunidades NR1, NR2 y NR3. NR1 es esencial para la formación del canal, mientras que las subunidades NR2 y NR3 modulan las propiedades del mismo. Existen ocho variantes funcionales de NR1 generadas por el empalme alternativo de los exones 5 (casete N1), 21 (casete C1) y 22 (casetes C2 o C2'), cuya inclusión diferencial confiere características farmacológicas y fisiológicas específicas a los canales que las contienen. Estudios previos han demostrado que los NMDARs de la retina difieren de los descritos en el SNC, y sufren cambios en sus propiedades bioquímicas y farmacológicas durante el desarrollo embrionario (DE), el origen de estas diferencias podría radicar en la composición heteromérica de los receptores de la retina y el cerebro que, hasta ahora, se desconocen.

El objetivo de este trabajo es analizar la expresión de las variantes de empalme de NR1, y de las subunidades NR2 en la retina diferenciada de pollo, así como su variación durante el DE. Su comparación con la expresión de las mismas en el cerebro y cerebelo podría contribuir a aclarar a nivel molecular las diferencias funcionales entre los NMDARs del SNC y la retina.

Se demostró que, a diferencia del cerebro, en la retina diferenciada predomina la expresión de NR1 con casete N1. La inclusión de esta isoforma en los receptores explica las diferencias en las propiedades del sitio del coagonista (glicina) y la acción de las poliaminas sobre el mismo en ambos tejidos. Durante el DE la expresión de la isoforma que carece del casete N1 decrece paralelamente al aumento de la isoforma que lo contiene. Este hallazgo implica que los fármacos empleados para inhibir o estimular el efecto de la glicina en el cerebro y en la retina embrionaria son ineficientes en la retina diferenciada.

El análisis del extremo C-terminal demostró la expresión de variantes específicas del tejido, cuya secuencia indica un mecanismo de transporte y anclaje de los NMDARs

a la membrana en las aves diferente del descrito para mamíferos. Se encontró una nueva variante de empalme de NR1 generada por la inclusión de un exón no descrito previamente (C3), que contiene una secuencia consenso para fosforilación por la caseína cinasa II. Su expresión coincide con el período del DE en que se generan ondas de calcio espontáneas, determinantes para la formación de sinapsis en la retina, lo que sugiere la participación de los NMDARs que lo contienen en dicho proceso.

El análisis de la expresión de las subunidades NR2 demostró que en la retina diferenciada se expresan NR2A, NR2B y NR2C. La inclusión diferencial de estas subunidades en el receptor le confiere al canal propiedades fisiológicas características. Durante el DE, la regulación de la expresión de los NMDARs es esencial para el control de los cambios de la concentración intracelular de Ca^{++} que acompañan la consolidación de las sinápsis. La expresión de NR2B y NR2D se observa al E8, alcanza un máximo al E13, y disminuye hacia la eclosión. En la retina diferenciada, en tanto que NR2B mantiene su nivel basal de expresión, NR2D deja de expresarse. La maduración del SN y la consolidación de las conexiones sinápticas conllevan el aumento de la expresión de NR2A en paralelo con la represión de la expresión de NR2B en respuesta a la actividad neuronal. Dado que los receptores que incluyen NR2B tienen mayor permeabilidad al Ca^{++} que los que incluyen NR2A, el cambio que sufre la expresión de ambos es indispensable para la consolidación de las sinápsis que, en la retina de pollo se observa entre E14 y E20.

La subunidad NR2C se expresa casi exclusivamente en el cerebelo y en la retina, y le confiere a los receptores baja permeabilidad al calcio y poca sensibilidad al bloqueo por Mg^{++} . Nuestros datos demuestran que, a diferencia de la rata, la retina de pollo expresa NR2C desde etapas tempranas del desarrollo y esta expresión se mantiene constante a lo largo del DE, lo que apoya la existencia de características distintivas de los NMDARs de la retina de las aves.

La expresión del casete N1 en NR1 y de NR2C en la retina, explica en gran medida las propiedades farmacológicas observadas previamente en este tejido.

ABSTRACT

The differential expression of glutamate receptors in the retina establishes the basis for the complex excitatory connectivity in this tissue. Among ionotropic glutamate receptors, the NMDA subtype plays a key role in retinal synaptic circuitry. Molecular cloning and functional expression studies have revealed at least seven members of the NMDA receptor channel subunits, included into three different families: NR1, NR2 (A-D), and NR3 (a and b), which assemble as variable tetramers. NR1 subunit is essential to the formation of the channel whereas different combinations of NR2 and NR3 subunits play a modulatory role. The multiplicity of NMDA receptor subunits accounts for the functional diversity of these structures. The alternative splicing of exons 5, 21, and 22 in the rat NR1 pre-mRNA generates eight isoforms further extending NMDAR diversity. Previously, NMDARs had been characterized in the chick retina, and shown to differ biochemically and pharmacologically from those described in the brain. The inclusion of different NR1 splice variants or NR2 subunits in the heterooligomeric channel could account for these differences. Thus changes in the glutamatergic response during development can occur through changes in channel properties due to alterations in the alternative splicing of NR1 gene and/or differential expression of NR2 subunits. The aim of this thesis is to determine the NMDAR subunits present in the chick retina, and to examine their expression during retinal development, since it may be an important factor to consider when determining the physiological characteristics of NMDA receptors in this tissue. We demonstrated that NR1 isoforms containing exon 5 increase their expression during embryonic development until they reach the mature levels unlike the cerebral ones, which mainly lack this exon. Retinal NR1 also differs from the brain in its C-terminal splice variants since it expresses, in addition to a splice variant containing C1 and C2 cassettes, a novel isoform containing an additional putative alternative splice exon. The 41bp insertion encodes a 6 amino acid sequence (C3 cassette) containing a predicted casein kinase II phosphorylation site. Molecular cloning of chick NR1 gene confirmed the existence of this novel cassette. Noticeably, the chick gene 3' region differs significantly from the mammalian gene; besides the existence of C3 cassette, the C2 cassette was shown to contain a myristoylation site, in contrast, no PDZ binding

domains were identified in C2'-containing isoforms. These data suggest important differences in membrane targeting and anchoring of these receptors. Moreover, the developmental profile of these isoforms parallels the generation of spontaneous calcium waves which are determinant for synapse consolidation in the retina.

Physiologic regulation of NMDAR properties is achieved through the control of subunit expression, particularly of the NR2 family. Our results demonstrate that the mature retina expresses NR2A, NR2B and NR2C. The expression of NR2C partially explains the pharmacological differences between the brain and the retina. However, a detailed analysis of the heteromeric composition of NMDARs is required to determine the subunit assembly responsible for the characteristic features of retina NMDARs.

Among ionotropic glutamate receptors, the NMDA subtype plays a key role in retinal synaptic circuitry. NMDARs heteromeric composition determines important physiological and biochemical properties, essential for its function as coincident detectors for correlated activity, an important feature required for the refinement of connections during development and the activity-dependent potentiation or depression of synaptic inputs. We demonstrate here that NR2B and NR2D predominate at early developmental stages decreasing their expression thereafter. In contrast, NR2A mRNA levels increase from E8 towards maturation, with maximal expression at post-hatching day 3. NR2C is steadily expressed from early stages, opposed to the cerebellum; the lack of significant changes in the expression of this subunit compared to NR2A/2B and 2D suggests an important maintenance role for NR2C in the distinct features displayed by NMDARs in the retina.

INTRODUCCIÓN

El glutamato (Glu) es el neurotransmisor excitador más importante en el Sistema Nervioso Central (SNC), donde se ha demostrado su intervención en procesos importantes como el aprendizaje y la memoria, así como en la muerte neuronal que se presenta en la epilepsia, enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, y desordenes neurológicos como la isquemia, la anoxia o el infarto (Michaelis, 1998).

Además de jugar un papel preponderante en la neurotransmisión, induciendo cambios duraderos en la excitabilidad neuronal en fenómenos como la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD), el Glu actúa como un estímulo quimiotáctico importante durante el desarrollo neuronal temprano y la sinaptogénesis. Durante este proceso se ha demostrado, asimismo, que la activación de los receptores para L-Glu disminuye selectivamente la síntesis de DNA y la división celular en las neuronas progenitoras de la zona ventricular de la corteza cerebral embrionaria. Este aminoácido, es uno de los estímulos para la iniciación de la migración neuronal en el desarrollo de la corteza cerebelar y actúa como modulador del crecimiento axonal y la formación de sinapsis. El L-Glu es también un factor de sobrevivencia para algunas neuronas en cultivo, así como para la formación de vías axonales y sinapsis en la retina, el núcleo geniculado y la corteza visual (Michaelis, 1998).

La diversidad de efectos generados por el Glu se explica por su interacción con múltiples tipos de receptores acoplados a diversas vías de transducción de señales, así como a diferencias en su concentración extracelular. A concentraciones del orden de [nM] el Glu funciona como neurotransmisor o como factor trófico durante el desarrollo embrionario (DE), mientras que una concentración extracelular elevada, el Glu puede inducir la muerte neuronal por excitotoxicidad, tanto en el SNC como en la retina (Michaelis, 1998; López-Colomé, 1986).

Los receptores de glutamato y su clasificación

El Glu ejerce su acción a través de la interacción con dos grupos de receptores específicos: ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores metabotrópicos (mGluRs)

se acoplan, a través de proteínas G triméricas, a la activación de cascadas de señalamiento intracelular. En contraste, los receptores ionotrópicos (iGluRs) son proteínas oligoméricas que forman canales catiónicos inespecíficos activados por un ligando (Michaelis, 1998).

La habilidad del glutamato para actuar sobre diversos tipos de receptores genera una amplia gama de respuestas en las sinapsis glutamatérgicas. Esta diversidad se incrementa por mecanismos de modificación postranscripcional, como la edición del mRNA y el procesamiento por empalme alternativo, así como mecanismos de modificación postraducciona como la fosforilación y la desfosforilación de los receptores, así como la regulación de su expresión en la membrana (Michaelis, 1998).

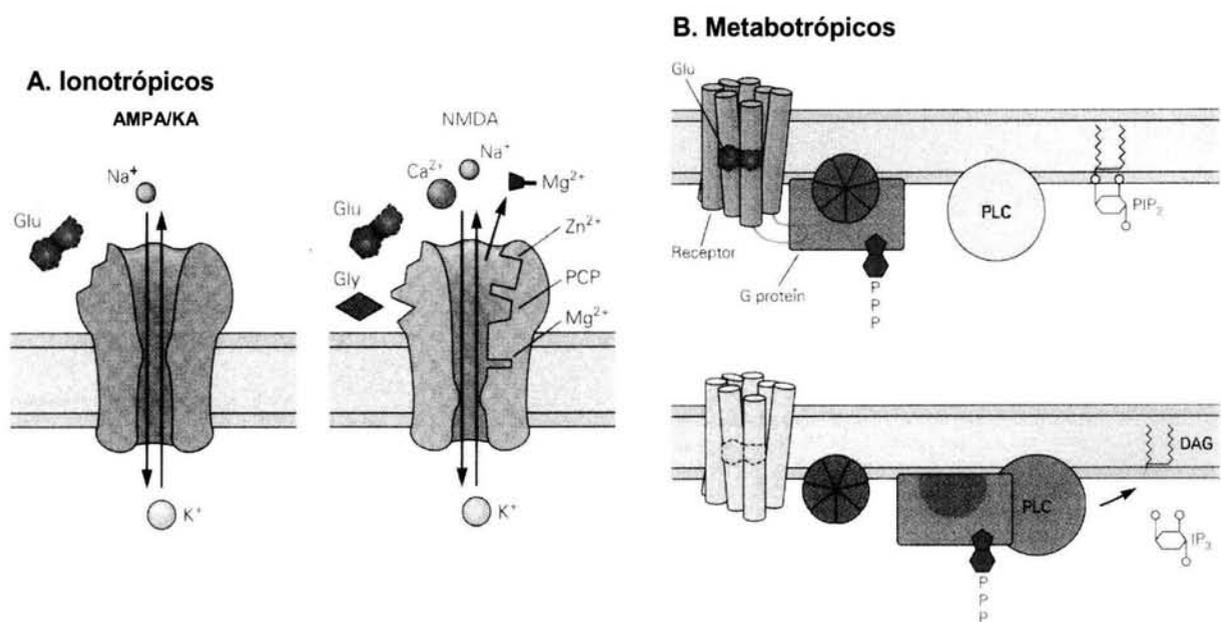


Figura 1. Receptores de glutamato. **A.** Los receptores de tipo ionotrópico se clasifican en receptores de AMPA/KA y receptores de NMDA. Los primeros son permeables principalmente al Na⁺, en tanto que los segundos son principalmente permeables al Ca⁺⁺. Glu, glutamato; Gly, glicina; PCP, fenciclidina. **B.** Los receptores de tipo metabotrópico están acoplados a una proteína G que activa una cascada de segundos mensajeros. PLC, fosfolipasa C; DAG, Diacilglicerol, IP₃, Inositol 1, 4, 5,bifosfato. Modificado de Kandel E, JH Schwartz, TM Jessell (2000) "Principles of Neural Science" 4ª edición, McGraw Hill.

Receptores de glutamato de tipo metabotrópico.

Los mGluRs constituyen un grupo diverso con características distintivas con respecto a otros miembros de la superfamilia de receptores metabotrópicos. Son proteínas de alto peso molecular cuyo dominio N-terminal es particularmente extenso, formado por más de 500 aminoácidos, e incluye el sitio de unión a glutamato; tienen siete segmentos transmembranales y una región C-terminal de longitud variable en la cara citosólica de la membrana, a través de la cual los receptores se acoplan a proteínas G. A diferencia de otros receptores metabotrópicos, como los adrenérgicos o dopaminérgicos, las regiones de alta homología de los mGlu no están en los segmentos transmembranales sino en la región N-terminal, particularmente el sitio de unión del ligando, y el tercer lazo intracelular, que junto con la región C-terminal es determinante para la interacción de los receptores con proteínas G triméricas. La unión de los receptores a través de sus regiones C-terminal con distintos tipos de proteínas G promueve la activación de distintas vías de señalamiento intracelular.

Hasta la fecha se han clonado 8 diferentes subtipos (mGlu 1-8), cuya diversidad aumenta a su vez por empalme alternativo en la región 3' del pre-mRNA de las subunidades mGluR1, mGluR4 y mGluR5. Los mGluRs se incluyen en tres grupos de acuerdo con la similitud de su secuencia, sus propiedades farmacológicas y sus mecanismos de transducción de señales.

Grupo I

La mayor parte de los receptores del grupo I (mGluR1 y mGluR5) son postsinápticos, y se acoplan principalmente a la vía de los fosfoinosítidos; sin embargo, se ha demostrado que las variantes mGluR1a y mGluR5a/b inducen la activación de la adenilil ciclasa (AC). El mecanismo de activación de la AC no se conoce bien, pero podría estar mediado por una proteína G_s (Conn, *et al.*, 1994). La activación de la fosfolipasa C (PLC) se lleva a cabo a través de la interacción de los receptores con proteínas G_q . Esta enzima cataliza la hidrólisis del fosfolípido de membrana fosfatidilinositol-4-5-difosfato (PIP2) generando dos segundos mensajeros: el inositol 1-4-5 trifosfato (IP3) y el diacil-glicerol (DAG). El primero libera

Ca⁺⁺ de las pozas intracelulares a través de su interacción con receptores en el retículo endoplásmico; el DAG activa en forma sinérgica con el Ca⁺⁺ a la proteína cinasa C (PKC), que juega un papel muy importante en la cascada de señalamiento por fosforilar a una gran variedad de proteínas de la membrana plasmática.

El quisqualato (QA) es el agonista más potente en los receptores mGlu de grupo I, y su potencia es mayor que la determinada para los receptores de tipo AMPA/KA. El análisis farmacológico de mGlu1a en sistemas heterólogos demuestra que tienen el siguiente orden de potencia: QA > L-Glu > Ibotenato > L-2-(carboxiciclopropil)-glicina-I (L-CCG) > 1S,3R-ACPD. Aunque es difícil distinguir fármacológicamente entre los mGluR1 y mGluR5, éste último tiene mayor sensibilidad al ACPD que el mGluR1 (Michaelis, 1998).

Grupo II

Los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II (mGluR2 y mGluR3) se localizan principalmente en la presinapsis, actuando como moduladores de la liberación tanto de glutamato como de otros neurotransmisores (Alagarsamy, *et al.*, 2001). La interacción de estos receptores con proteínas G_i los acopla a la inhibición de la adenilil ciclasa (AC), y el decremento concomitante de la concentración de cAMP con la consiguiente inactivación de la proteína cinasa A (PKA). Estos receptores son sensibles principalmente al agonista L-CCG-I y poseen mayor sensibilidad al ACPD que los receptores de tipo I. La dihidroxi-fenilglicina (DHPG) es un agonista más potente que el ACPD en este tipo de receptores (Michaelis, 1998).

Grupo III

Los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, y mGluR8) al igual que los receptores del grupo II, son presinápticos y se acoplan negativamente a la AC. Sin embargo sus propiedades farmacológicas son diferentes, ya que responden principalmente al L-2-amino-4-fosfonobutirato (L-AP4) y son menos sensibles al L-CCG-I; por otra parte, no se han descrito antagonistas específicos para este grupo. A diferencia de los receptores de grupo II, la inhibición de la AC por este tipo de receptores no es total (Michaelis, 1998).

Los mGlu juegan un papel muy importante en la respuesta glutamatérgica en el SNC por modular la actividad de los receptores de tipo ionotrópico. Se ha observado que los mGlu de grupo II y III pueden atenuar la excitotoxicidad inducida por la activación de los NMDARs, en tanto que los receptores de grupo I aumentan selectivamente las corrientes inducidas por los NMDARs, lo que resulta de particular importancia en procesos fisiológicos como la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD). Asimismo se ha identificado a los mGluRs como blanco terapéutico para diversas patologías: recientemente se ha determinado que la administración de antagonistas para los receptores de grupo I y agonistas de los receptores de tipo II tiene un efecto positivo en el tratamiento de padecimientos como la enfermedad de Parkinson, la de Alzheimer, y la depresión (Alagarsamy, et al., 2001).

Receptores de glutamato de tipo ionotrópico

Los receptores ionotrópicos (iGluRs) son proteínas heteroméricas en las que el ligando controla la apertura de un canal iónico. Sin embargo, a diferencia de otros canales iónicos regulados por ligando, los iGluRs poseen un extremo N-terminal muy extenso que les confiere un elevado peso molecular. Otra característica distintiva de estos receptores con respecto a otros canales activados por ligando es la generación de isoformas derivadas del proceso de edición, lo que determinó su inclusión en una superfamilia independiente (Dingledine, *et al.*, 1999).

La región N-terminal contiene, además del sitio de reconocimiento del ligando, elementos que modulan la actividad de los receptores. Adicionalmente, esta región tiene homología con dos proteínas periplásmicas bacterianas: la proteína que une glutamina (QBP) y la proteína que une lisina, arginina y ornitina (LAOBP), así como una región de alta homología con proteínas que unen ácidos grasos (FABPs). Por otra parte, la región que forma el poro es homóloga a los canales de potasio (Dingledine, *et al.*, 1999).

Los receptores ionotrópicos de glutamato se subdividen a su vez, con base en la afinidad por sus agonistas, sus características electrofisiológicas y la similitud de sus secuencias, en receptores de tipo N-metil-D-Aspartato (NMDA) y receptores de tipo

no-NMDA o AMPA/kaínico (AMPA/KA). Se ha propuesto que estos agonistas representan al L-Glu en sus conformaciones extendida (kaínico) y plegada (NMDA). Los primeros se relacionan con la respuesta rápida en la transmisión sináptica, en tanto que los segundos son responsables del componente lento de las corrientes postsinápticas (Michaelis, 1998).

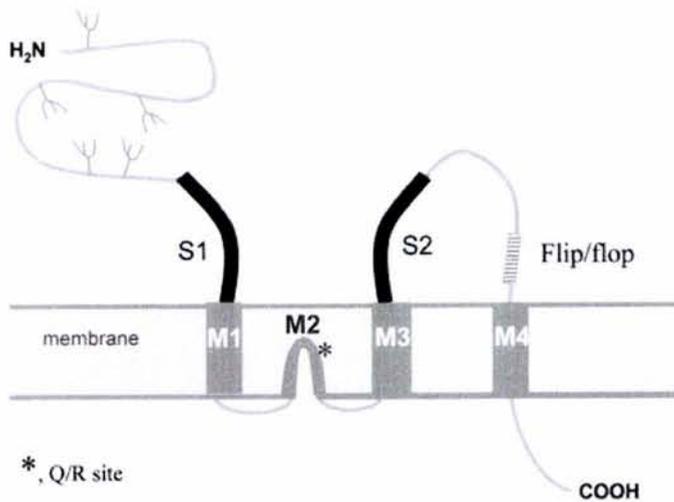


Figura 2 Topología de las subunidades de los receptores ionotrópicos de glutamato. Los segmentos transmembranales se muestran numerados en bloques grises. Es importante notar que el segundo segmento (M2) no atraviesa la membrana plasmática como en el caso de los canales de potasio. Los dominios de unión al ligando S1 y S2 se muestran como bloques negros. Los sitios de glicosilación se muestran como árboles en la región N-terminal. Las subunidades de los receptores de AMPA presentan un dominio Flip/Flop señalado como un bloque rayado; el sitio de edición Q/R en estos receptores se marcó con un asterisco (Dingledine, 1999).

Funcionalmente, los receptores de AMPA/KA median corrientes de activación y decaimiento rápido, no dependiente de voltaje, generadas principalmente por la entrada de Na^+ . La activación de los receptores para NMDA es, en contraste, lenta, de larga duración, está mediada principalmente por Ca^{++} , y requiere de una despolarización previa debido a que en condiciones fisiológicas, el canal está bloqueado por Mg^{++} . Estas diferencias en la cinética de apertura son de relevancia fisiológica, porque se ha demostrado que en diversas regiones del SNC los receptores de AMPA se colocan con los de NMDA en la membrana sináptica,

donde la rápida activación de los receptores de AMPA facilita la salida del Mg^{++} que bloquea a los receptores de NMDA permitiendo así su apertura.

Receptores de tipo no-NMDA

Actualmente se conocen nueve subunidades de los receptores ionotrópicos de tipo AMPA/KA (GluR). Éstas se han clasificado por homología y por su afinidad por el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) o ácido kaínico (KA). Los GluR1 a 4 tienen alta afinidad por AMPA y baja afinidad por KA, por lo que son llamados receptores de AMPA (AMPA), en tanto que los receptores para KA (KAR) tienen baja afinidad por AMPA y alta afinidad (KA1 y KA2) o afinidad moderada (GluR5 a 7) por el ácido kaínico (Michaelis, 1998).

Las cuatro subunidades de los AMPAR están sujetas a variaciones por empalme alternativo de los exones 14 y 15 que forman las isoformas flip y flop, que influyen de manera diferencial en la desensibilización de los receptores: Los GluR que contienen la variante flip se desensibilizan más lentamente que los que contienen la variante flop. Adicionalmente, se han identificado isoformas del extremo C-terminal en GluR2, GluR4, y las subunidades GluR5, GluR6 y GluR7, que podrían relacionarse fisiológicamente con la localización diferencial de los receptores en la membrana. El extremo C-terminal de GluR2, GluR3 y GluR4c tiene un sitio de interacción con dominios PDZ que les permite unir a las proteínas ABP, GRIP, y Pick1 que están involucradas en el agrupamiento y andamiaje de la densidad postsináptica.

Además de las diferencias en el empalme alternativo, los mRNA de los receptores AMPA/KA se procesan por edición post-transcripcional, lo que conduce al intercambio de un aminoácido en la proteína. El proceso de edición se ha identificado en los transcritos primarios de las subunidades GluR2, GluR5 y GluR6 donde el transcrito primario, que codifica para glutamina (CAG), se edita dando lugar a una arginina (CIG). El cambio de la Q por R en GluR2 conduce a una disminución en la permeabilidad al Ca^{++} y en la conductancia del canal. Adicionalmente, las subunidades GluR2, GluR3 y GluR4 se editan en el sitio R/G que precede a los exones flip/flop. La sustitución de arginina (AGA) por glicina (IGA) en GluR3 y GluR4 reduce el tiempo de recuperación de la desensibilización. Es importante señalar que

99% del mRNA para GluR2 se edita, y la remoción del sitio Q/R produce epilepsia y muerte temprana, lo que resalta la importancia de este proceso (Dingledine, *et. al.*, 1999).

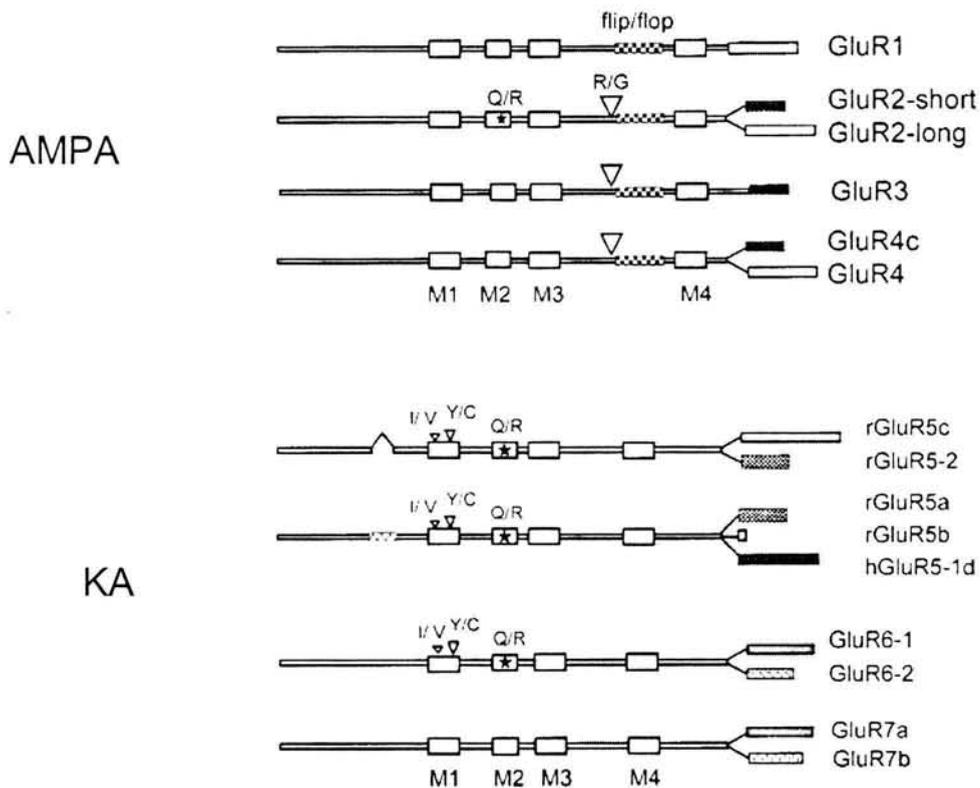


Figura 3 Variantes por empalme alternativo y edición de las subunidades de los receptores de AMPA/KA. Los segmentos transmembranales se muestran como bloques blancos. Los dominios flip/flop de los receptores de AMPA se muestran como un bloque cuadriculado. Las variantes por empalme alternativo en el extremo C-terminal se muestran como bloques gises cuya longitud es proporcional al número de aminoácidos que los conforman. Los sitios de edición se señalaron con flechas y asteriscos (Dingledine, 1999).

A principios de los años 90 se intentó sin éxito coexpresar subunidades de los iGluRs (NMDAR, AMPAR Y KAR) con la intención de analizar la formación de heterómeros funcionales. A partir de estos experimentos se llegó a la conclusión de que las subunidades sólo se ensamblan con miembros de su propia familia, proceso en el cual los segmentos transmembranales juegan un papel importante. Se ha descrito

que tanto las subunidades de los receptores de AMPA como las de KA pueden formar homómeros funcionales, sin embargo en condiciones fisiológicas parecen estar ensamblados como heteromultímeros.

Receptores de tipo NMDA

Los receptores de L-Glu de tipo NMDA (NMDARs) forman un canal iónico que permite la entrada principalmente de Ca^{++} y en menor medida de Na^+ . La actividad de los NMDARs está finamente controlada a través de seis sitios específicos: el sitio de reconocimiento con el cual interactúan los agonistas como el Glu y el NMDA, así como los antagonistas competitivos; el sitio de unión de los coagonistas glicina y D-serina; un sitio en el canal iónico al que se une el Mg^{++} , en forma dependiente del voltaje, regulando así la actividad del canal; un sitio más externo en el canal, con el cual interactúan los anestésicos disociativos como el (+) 5-metil-10-11-dehidro-5H dibenzo (a,d) ciclohepten-5-10-imina (MK-801), la ketamina y la fenciclidina, que actúan como inhibidores del canal en su conformación abierta; un sitio modulador negativo para el Zn^{++} , en el exterior del canal, y un sitio modulador para las poliaminas, que inhibe el ifenprodil (Dingledine, et al., 1999).

Los NMDARs son tetrámeros cuyas subunidades se ensamblan de manera variable. Hasta la fecha se han clonado tres familias de subunidades: GRIN1 (NR1), GRIN2 (NR2) y GRIN3 (NR3) (Moriyoshi, et al., 1991, Kutsuwada, et al., 1992, Ciabarra, et al., 1995). La subunidad NR1 es esencial para la formación del canal iónico, contiene el sitio de unión del coagonista glicina, y en esta subunidad reside la sensibilidad a los protones y al Zn^{++} . Se han descrito hasta ahora 8 variantes de NR1 (NR1a-h) generadas por el empalme alternativo de 3 exones: el 5, que da lugar a un casete en el extremo N-terminal (N1), el exon 21, que da lugar al casete C1, y el exon 22 con 2 sitios alternativos de terminación (C2 y C2') (Monyer, et al., 1992). Se ha demostrado que, aunque los canales homoméricos formados por NR1 son funcionales, la corriente generada por estos receptores es menor que la generada por la combinación de las subunidades NR1 y NR2, y que la corriente inducida por la estimulación de los NMDARs in vivo. Con base en estos resultados, se propuso que

los NMDARs incluyen, cuando menos, una subunidad NR1 y una o más subunidades NR2 y/o NR3 (Moriyoshi, et al., 1991).

Hasta el momento se han descrito 4 subunidades de tipo NR2 (NR2 A-D) codificadas por genes distintos, a diferencia de las isoformas de NR1. Los subtipos de NR2 se expresan de manera diferencial en las regiones del cerebro adulto, así como en las diferentes etapas del desarrollo embrionario, mientras que NR1 se distribuye de manera homogénea tanto en el espacio como en el tiempo (Michaelis, 1998).

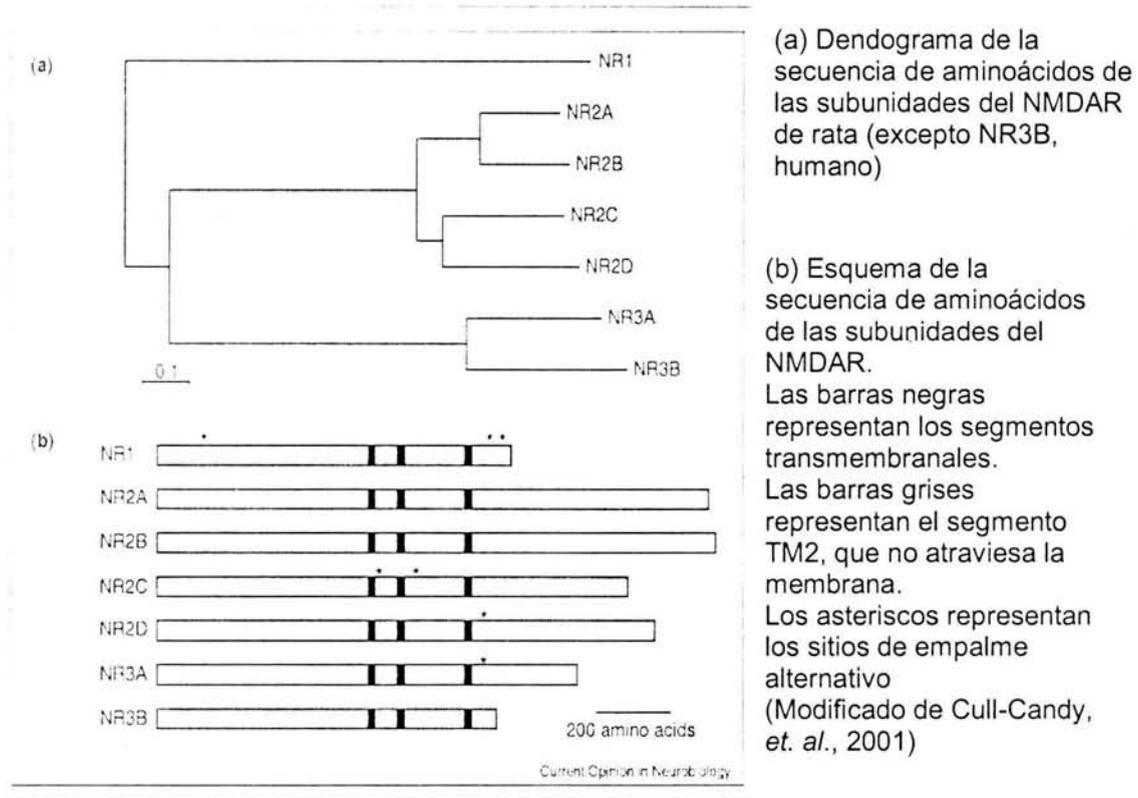
Las propiedades funcionales de los canales del receptor, como la afinidad aparente por los agonistas y su sensibilidad a los agonistas competitivos, así como el bloqueo por Mg^{++} , están determinadas por la variante de NR2 incluida en el heterómero (Tabla I). Sin embargo, los sitios de unión para poliaminas así como el sitio de unión para los anestésicos disociativos, se forman por la interacción entre las subunidades NR1 y las NR2.

Se ha descrito a la fecha dos tipos de NR3 (a y b), producto de distintos genes. NR3a se distribuye de manera generalizada en el SNC en tanto que la expresión de NR3b parece restringirse a las motoneuronas. NR3 es una subunidad reguladora cuya presencia disminuye las corrientes generadas por los heterómeros NR1/NR2 (Das, et al., 1998). En estudios recientes se demostró mediante la expresión en un sistema heterólogo, que los heterómeros NR1/NR3b forman receptores glicinérgicos excitadores insensibles a glutamato o NMDA, cuya actividad se inhibe por D-serina, un co-agonista de los NMDARs convencionales. A diferencia de los NMDARs caracterizados con anterioridad, el canal de estos receptores no se bloquea por Mg^{++} , por lo que se ha propuesto que podrían jugar un papel importante en la activación de las sinapsis de NMDA silenciosas; sin embargo, respuestas similares a las obtenidas en sistemas de expresión heterólogos sólo se han identificado en neuronas de la corteza cerebral (Chatterton, et al., 2002).

La diversidad funcional de los receptores para NMDA y su intervención en un gran número de procesos normales y patológicos deriva de la posibilidad de la formación de heterómeros diversos que, de acuerdo con su composición, difieren en sus propiedades y modulación en las diversas áreas del SNC así como durante la

diferenciación de las células que los forman (Kutsuwada, *et. al.*,1992; Monyer, *et.al.*,1994).

Figura 4



Estructura de los receptores de tipo NMDA

Estructura de la subunidad NR1.

El gene que codifica la subunidad NR1, de la rata, incluye 22 exones y genera, cuando menos, nueve variantes postranscripcionales por empalme alternativo del pre-mRNA (Hollmann y Heinemann, 1994, Zukin y Bennett, 1995), una de las cuales codifica para una proteína truncada que contiene un codón de término en el exón 3, por lo que carece de segmentos transmembranales y muy probablemente no es funcional. Las ocho isoformas restantes se forman por la inserción o remoción de los exones 5 y 21, así como por el uso alternativo de dos sitios aceptores de empalme en el exón 22. A la fecha, se han clonado siete isoformas a partir de bibliotecas de cDNA (Zukin y Bennett, 1995).

El exón 5 del gene de NR1 de la rata tiene 63 pb y codifica para el casete N1 del segmento amino terminal de la proteína, formado por 21 aminoácidos, de los cuales 6 están cargados positivamente. Se ha propuesto que estos aminoácidos forman un lazo sobre la boca del canal, lo que modifica sus propiedades. En los NMDARs que incluyen las isoformas que contienen el casete N1 no se observa potenciación del efecto del glutamato por poliaminas ni por Zn^{++} (Traynelis, *et al.*, 1995), lo que podría deberse a la naturaleza catiónica de estos compuestos. La presencia del casete N1 en la subunidad NR1 de los NMDARs reduce aproximadamente 5 veces la afinidad de los receptores por los agonistas, al compararse con los receptores que carecen de este casete. Se ha demostrado, asimismo, en estos receptores, una reducción de la sensibilidad hacia algunos antagonistas como el APV (2-amino-5-fosfonovalerato), el CPP (ácido 3-((+)-2-carboxipiperazin-4-yl)-propil-1-fosfónico), el 7-CK (ácido 7-clorokinurénico) y el MK-801. Adicionalmente, se determinó que las variantes de NR1 que contienen N1 generan corrientes de mayor amplitud que las variantes que carecen de este casete (Durand, *et al.*, 1993; Hollmann, *et al.*, 1993).

El exón 21, formado por 111 pb, codifica para el casete alternativo C1 de la región carboxilo terminal de la proteína, responsable de la regulación de NR1 por la proteína cinasa C (PKC) y por la proteína cinasa A (PKA) (Tingley, *et al.*, 1993, Tingley, *et al.*, 1997), así como de la inhibición de las corrientes del receptor a través de un sitio para la unión de calmodulina (Ehlers, *et al.*, 1996). Esta región de NR1 es responsable de la inserción y agrupamiento de los NMDARs en la membrana (Okabe, *et al.*, 1999) y de su interacción con los neurofilamentos (Ehlers, *et al.*, 1998).

El exón 22 codifica para el casete carboxilo-terminal C2 de la proteína; el uso de un sitio aceptor alternativo en este exón genera la remoción de los primeros 356 pb, dando lugar al casete C2' de la proteína, compuesto por 22 aminoácidos. Las variantes que no contienen C1, tienen un alto índice de expresión membranal debido a que el casete C1 contiene una señal de retención en el retículo endoplásmico, mientras que aquellas que incluyen el casete C2' contienen un sitio de interacción con dominios PDZ que facilita su expresión membranal (Standley, *et al.*, 2000).

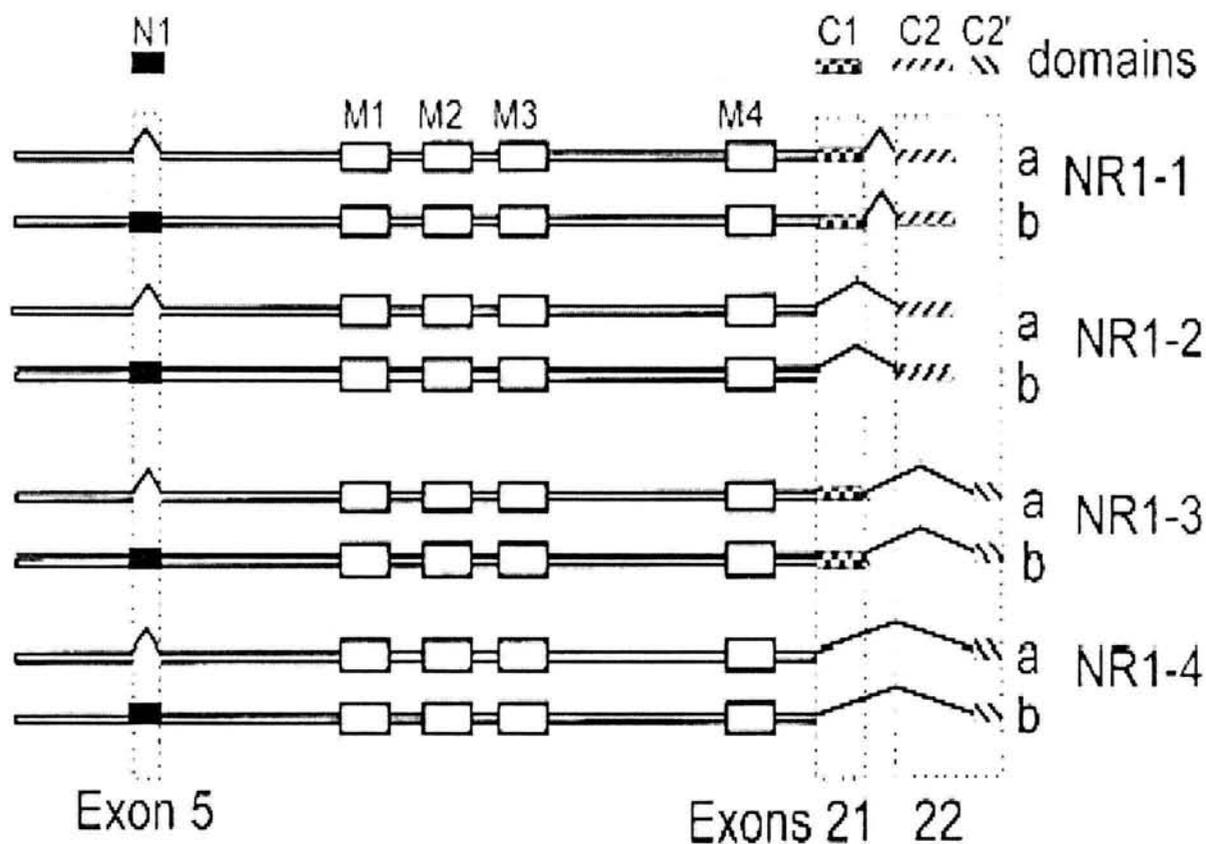


Figura 5. Variantes por empalme alternativo de NR1 de rata. Los segmentos transmembranales se esquematizan como bloques blancos. El casete alternativo N1 se muestra como bloque negro, el casete C1 se muestra como un bloque cuadrado con líneas de cuadrícula y los casetes C2 y C2' como bloques rayados (Dingledine, 1999).

Estructura de las subunidades NR2

Las subunidades NR2, al igual que otras subunidades de los iGluRs (Figura 2) tienen cuatro segmentos transmembranales, el extremo amino es extracelular, y el extremo carboxilo es intracelular. El sitio de unión para glutamato se localiza en NR2, por lo que esta subunidad influye decisivamente en las características bioquímicas y electrofisiológicas de los receptores. Las propiedades de los NMDARs se regulan, principalmente, mediante el control de la expresión de sus subunidades, en particular las de la familia NR2. El perfil de expresión tanto durante el desarrollo embrionario como en las diferentes áreas del SNC se correlaciona con los periodos de maduración y refinamiento sináptico, o bien con fenómenos plásticos en el tejido diferenciado, respectivamente (Scheetz y Constantine-Paton, 1994).

Tabla I. Diversidad fisiológica de los NMDARs

Propiedad Farmacológica	NR1a/NR2A	NR1a/NR2B	NR1a/NR2C	NR1a/NR2D
EC ₅₀ (μ M) glutamato	1.7	0.8	0.7	0.4
EC ₅₀ (μ M) glicina	2.1	0.3	0.2	0.1
Constante de desactivación (τ_w)	50 ms	300 ms	280 ms	1.7 s
Sensibilidad al Mg ⁺⁺	Alta	Alta	Baja	Baja
Corriente al pico (nA)	364	667	191	70
IC ₅₀ para protones (pH)	7.2	7.3	6.2	7.3
Estimulación por espermina dependiente de glicina	+	+	-	-
Disminución de la afinidad inducida por espermina	-	+	-	-

Modificado de Yakamura T. y Shimoji K. (1999) *Progress in Neurobiology* 59: 279-298

Las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas que las NR2 le confieren a los heterómeros que las contienen se ha determinado en sistemas heterólogos (Vicini, *et al.*, 1998). El tiempo de decaimiento de las corrientes excitadoras postsinápticas (EPSCs) mediadas por los NMDARs y la afinidad aparente de los receptores por el glutamato y los antagonistas son propiedades que dependen en gran parte de las subunidades NR2 presentes en los heterómeros. Es importante mencionar que en la mayor parte de los estudios se ha analizado únicamente heterómeros que contienen a la subunidad N1-1a (sin casete N1, y con casetes C1 y C2), que es la más abundante en el SNC. Se ha demostrado que las constantes de desactivación del receptor varían en el orden: NR2A < NR2C = NR2B << NR2D (ver Tabla I). La afinidad de los receptores por el glutamato y la glicina depende también del tipo de NR2 incluida en el heterómero, y su relación es inversa a la establecida para las constantes de desactivación. Variaciones en el tipo de NR2 influyen también en la conductancia del canal y la sensibilidad de los receptores al Mg⁺⁺. Los receptores que contienen NR2A y NR2B forman canales con alta conductancia y sensibilidad al Mg⁺⁺, en tanto que la inclusión de NR2C y NR2D produce canales de baja conductancia y sensibilidad al Mg⁺⁺.

Localización de los NMDARs en la membrana sináptica

La expresión de los NMDARs en la membrana y en particular en la sinapsis es un proceso finamente regulado de gran importancia fisiológica. La inserción y remoción de los receptores sinápticos como respuesta a cambios en la actividad neuronal es un proceso clave en la plasticidad sináptica. En las sinapsis diferenciadas, el transporte e inserción de los NMDARs en la membrana sináptica, como respuesta a estímulos dependientes de la actividad, se lleva a cabo en un lapso de horas, por lo que el proceso regula la actividad del glutamato a mediano plazo a través de la accesibilidad de los receptores (Wenthold, *et al.*, 2003).

La incorporación de receptores en la membrana sináptica como resultado de la estimulación neuronal originalmente se consideró como propiedad exclusiva de los receptores de AMPA, al demostrarse la participación de este proceso en la activación de las llamadas "sinapsis silenciosas" de NMDA (Song y Huganir, 2002). Sin embargo, recientemente, se ha demostrado que los NMDARs también cambian su localización sináptica como respuesta a la actividad. Estos cambios en la localización pueden ser rápidos, en cuyo caso el proceso involucra la movilización de receptores extrasinápticos, o lentos, en cuyo caso es necesaria la síntesis de proteínas y el transporte de receptores a la membrana (Wenthold, *et al.*, 2003). Estudios llevados a cabo tanto en sistemas heterólogos como en neuronas demostraron que la expresión en la membrana de NR2B no se modifica por su sobreexpresión ni por la actividad; la expresión de NR2A en la membrana, por el contrario, depende de ambos factores. Estas características apoyan la hipótesis de que durante el desarrollo del SNC la subunidad NR2A reemplaza total o parcialmente a la subunidad NR2B en los receptores sinápticos en forma dependiente de la actividad (Barria y Malinow, 2002). Los NMDARs se localizan, generalmente, en regiones de la membrana plasmática altamente organizadas denominadas densidades postsinápticas (PSDs). Las PSDs están formadas por complejos macromoleculares que incluyen, además de los receptores, a proteínas del citoesqueleto, proteínas de anclaje, proteínas adaptadoras, cinasas, y enzimas relacionadas con en la generación de segundos mensajeros (Sheng, 2002). Uno de los componentes principales es la proteína PSD-

95, que pertenece a la familia de las “guanilil cinasas asociadas a la membrana” (MAGUKs). Además de la PSD-95, entre las proteínas de esta familia se encuentran, otras como PSD-93, SAP97, y SAP102.

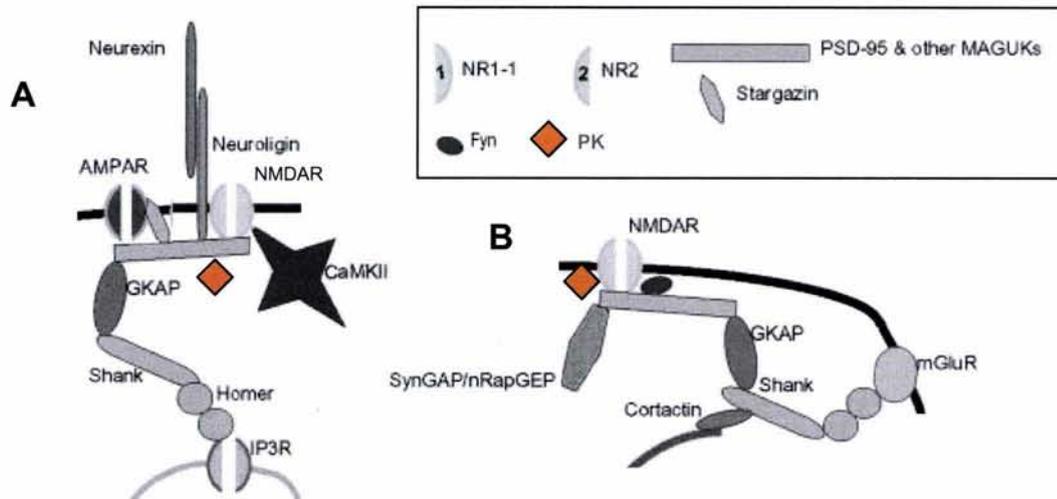


Figura 6. Proteínas involucradas en la estructura de las sinapsis glutamatergicas.

A. Interacción de los NMDAR con los AMPAR. GKAP, guanylate kinase domain-associated protein; IP3R, Inositol 1,4,5 triphosphate Receptor; CaMKII, Calcium/Calmodulin kinase II

B. Interacción de los NMDAR con los mGlu. SynGAP/nRapGEP, synaptic RAS-GTPase activating protein (Modificado de Wenthold, *et al.*, 2003).

Originalmente se propuso que la función de estas proteínas era exclusivamente estructural, ya que a través de sus dominios PDZ forman cadenas que enlazan a los NMDARs con otros receptores de glutamato, canales iónicos, cinasas, e incluso con los receptores para inositol trifosfato (IP3), a través de otras proteínas adaptadoras como Shank y Homer (Wenthold, *et al.*, 2003). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que las MAGUKs juegan un papel muy importante en el transporte de los receptores a la membrana. Por medio de un ensayo de dos híbridos en levadura, se demostró que SAP102 interactúa, a través de sus dominios PDZ con sec8. Esta proteína se encuentra en las vesículas de secreción en el aparato de Golgi, y forma parte del complejo de anclaje de vesículas del sistema de exocitosis en la membrana plasmática (Sans, *et al.*, 2003).

Las subunidades de los NMDARs se ensamblan como tetrámeros en el retículo endoplásmico (RE). Recientemente se demostró que es necesario que las subunidades NR1 se unan entre ellas mediante un enlace disulfuro, para su exportación a la membrana (Papadakis, *et al.*, 2004). Adicionalmente, se ha demostrado que es indispensable el ensamble de NR1 con NR2 y/o NR3 para que sea posible el tránsito a las PSDs (Barria y Malinow, 2002, Matsuda, *et al.*, 2003). Una vez ensamblados, los receptores se asocian con PSD-95 y otras MAGUKs a través del extremo C-terminal de NR1 y de NR2A y NR2B. A este respecto, Okabe y cols. demostraron que las variantes de NR1 cuyas colas citoplásmicas son pequeñas (aquellas que sólo contienen el casete C2') salen del RE y se localizan en la membrana en mayor proporción que aquellas con una cola citoplásmica larga (aquellas que contienen casete C1 y casete C2). Con base en estos resultados se propuso que la interacción con PSD-95 a través del casete C2' promueve el tránsito de los receptores (Okabe, *et al.*, 1999). Posteriormente se demostró que el casete C2' contiene un motivo de reconocimiento para dominios PDZ, a través del cual NR1 se une a PSD-95. Además la señal de retención en el retículo endoplásmico en el casete C1 de NR1 se enmascara mediante su interacción con proteínas que contienen dominios PDZ (como PSD-95) lo que permite su exportación a la membrana plasmática (Standley, *et al.*, 2000).

Una vez en las PSDs, la interacción de NR2B con PSD-95 es indispensable para la estabilización de los receptores en la membrana, impidiendo su internalización. Adicionalmente a la interacción con las MAGUKs, el nivel de fosforilación de las subunidades del NMDAR es determinante para su estabilización en la membrana. La activación de la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA) tiene un efecto positivo sobre la estabilización de los NMDARs en la membrana: Se ha demostrado que la fosforilación de la serina 897, promueve su interacción con proteínas de citoesqueleto así como su transporte a las PSDs (Leonard y Hell, 1997, Tingley, *et al.*, 1997). Del mismo modo, la fosforilación de las serinas 896/897 de NR1 por la proteína cinasa C (PKC) promueve la salida de los receptores del RE (Scott, *et al.*, 2001). La cinasa II dependiente de Ca^{++} /calmodulina (CaMKII) es importante también para el establecimiento de interacciones entre los NMDARs y los receptores de

AMPA en la membrana postsináptica. La CaMKII se une a los NMDARs a través de sitios de reconocimiento en NR1, NR2A, y NR2B. La unión, por lo menos en el caso de NR2B, no depende del estado de fosforilación de la cinasa; cuando la CamKII se une a NR2B, adquiere una conformación en la que la actividad de la enzima es independiente de su estado de fosforilación (Leonard, *et al.*, 1999). En este estado, la CamKII promueve el reclutamiento de otras proteínas (como MAGUKs y Stargazing) y produce cambios en la actividad de los receptores de AMPA (Wenthold, *et al.*, 2003).

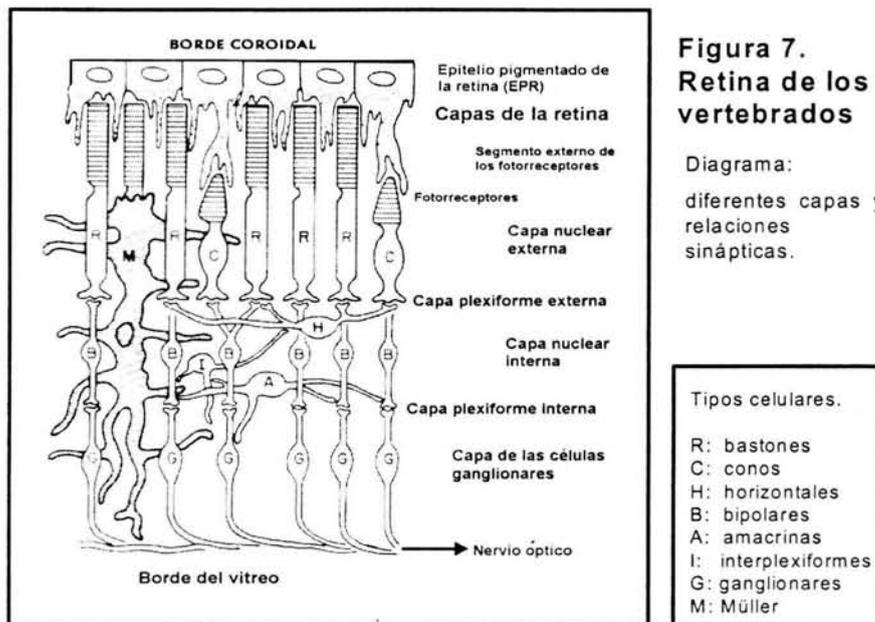
La remoción de receptores de la sinapsis es un proceso que depende de la actividad sináptica y están involucradas tanto cinasas como proteínas de la vía endocítica: La fosforilación por PKC de la cola citoplásmica de NR2B interrumpe su interacción con PSD-95 y favorece la interacción con la proteína adaptadora endocítica AP2 que al unirse a la clatrina, promueve la endocitosis de proteínas membranales (Wenthold, *et al.*, 2003). La estabilización de la subunidad NR2A en la membrana también está dictada por el nivel de fosforilación de su extremo C-terminal. Al igual que NR2B, NR2A posee un dominio de interacción con AP2; sin embargo, en este caso, la interacción con esta proteína adaptadora depende de que la tirosina en el sitio de reconocimiento por AP2 no se encuentre fosforilada, ya que este mismo residuo es sustrato de fosforilación por la proteína cinasa Src (Carroll y Zukin, 2002).

Neurotransmisión excitadora en la retina

Morfología de la retina

La retina, al igual que el SNC, se desarrolla a partir del neuroectodermo; es una capa de tejido nervioso de aproximadamente 300µm de espesor localizada en la parte posterior del ojo. Su función es recibir los estímulos visuales y llevar a cabo los primeros pasos del procesamiento de la información visual (Sheperd, 1974).

Este tejido tiene una organización laminar en la que se distinguen por su posición, morfología, propiedades bioquímicas y fisiológicas, 6 tipos neuronales: fotorreceptores (conos y bastones), células bipolares, ganglionares, horizontales, amacrinas e interplexiformes (Adler y Farber, 1986), además de dos tipos de células gliales, las células de Müller y los astrocitos.



**Figura 7.
Retina de los
vertebrados**

Diagrama:
diferentes capas y
relaciones
sinápticas.

Tipos celulares.

- R: bastones
- C: conos
- H: horizontales
- B: bipolares
- A: amacrinas
- I: interplexiformes
- G: ganglionares
- M: Müller

La Figura 7 muestra un esquema de la estructura de la retina. La capa más externa es el epitelio pigmentado (EPR) cuyas células se organizan en una monocapa, que descansa sobre la membrana de Bruch, y que separa a la retina neural de los capilares sanguíneos coroideos. La segunda capa incluye los segmentos internos y externos de los fotorreceptores; a ésta le sigue la capa nuclear externa formada por los cuerpos celulares de los fotorreceptores. Las sinapsis formadas por los fotorreceptores con las células bipolares y células horizontales conforman la capa plexiforme externa (OPL). La siguiente capa es la capa nuclear interna (INL) donde se localizan los cuerpos neuronales de las células bipolares, horizontales, y amacrinas, que establecen sinapsis con las células ganglionares en la capa plexiforme interna (IPL). La capa de células ganglionares (GCL) contiene, además de las células que le dan nombre a este estrato, células amacrinas desplazadas. De esta capa, surgen los axones de las células ganglionares cuyas fibras eferentes convergen para formar el nervio óptico.

El EPR es una monocapa de células epiteliales estrechamente asociada con los fotorreceptores. Estas células contienen gránulos de melanina, que les da un color

oscuro, lo que les permite absorber la luz, mejorando así la resolución de las imágenes. Adicionalmente, estas células juegan un papel importante en el transporte y almacenamiento de metabolitos indispensables para la función de los fotorreceptores. Otra función importante del EPR es la fagocitosis de los paquetes de discos de los segmentos externos de los fotorreceptores. Tanto los conos como los bastones renuevan continuamente los discos de los segmentos externos, esta renovación en la región basal de los fotorreceptores, conlleva el desprendimiento de los discos más viejos en los segmentos externos, que son fagocitados por las células del EPR.

Las células de Müller son células gliales orientadas radialmente, que se extienden a todo lo largo de la retina desde la capa de fibras del nervio óptico hasta el nivel de los segmentos internos de los fotorreceptores. La regulación de la homeostasis de K^+ en la retina es una de las funciones mejor caracterizadas en estas células. Adicionalmente, juegan un papel fundamental en el metabolismo de la retina por remover los neurotransmisores del espacio sináptico. Las células de Müller poseen sistemas de recaptura de alta afinidad para varios neurotransmisores, fenómeno esencial tanto para la terminación de la neurotransmisión, como para evitar la difusión de transmisores fuera del espacio sináptico (Newman y Reichenbach, 1996). Las células fotorreceptoras se han clasificado por su morfo-fisiología en conos y bastones. Los primeros están encargados de la visión diurna y son los responsables de la visión a colores; en los humanos existen tres tipos: los conos "S" o "azules" que absorben la luz de longitud de onda corta (430 nm), los conos "M" o "verdes" que absorben la luz de longitudes de onda media (cercanas a los 530 nm), y los conos "L" o "rojos" que absorben la luz alrededor de los 564 nm. Los bastones están encargados de la visión nocturna o escotópica y absorben la luz de longitud de onda cercana a los 500nm (Massey y Maguire, 1995).

La retina de mamífero contiene de 9 a 12 tipos diferentes de células bipolares (Masland, 2001). La existencia de varios tipos de células bipolares se describió inicialmente sobre bases morfológicas, sin embargo, fisiológicamente presentan diferencias importantes. Se distinguen por su respuesta diferencial a los estímulos luminosos: las células de tipo "ON" se despolarizan como respuesta a la luz, en tanto

que las células "OFF" se hiperpolarizan. Morfológicamente, se distinguen por el sitio de ramificación de sus terminales en la capa plexiforme interna: las células OFF extienden sus dendritas en la parte superior o *sublámina "a"*, en tanto que las células bipolares "ON" ramifican en la *sublámina "b"*, localizada en la parte inferior de la IPL; estas células además de ser morfológicamente diversas se distinguen por sus receptores para L-Glu (Massey y Maguire, 1995). Adicionalmente, las células bipolares se diferencian por el tipo de fotorreceptor con el cual hacen sinapsis. Por ejemplo: Los conos "L" se asocian exclusivamente con un solo tipo de células bipolares (bipolares de cono "L") (Masland, 2001). En contraste, sólo se ha identificado un tipo de célula bipolar asociada a los bastones cuya respuesta a la luz es de tipo "ON". Éstas se diferencian de las bipolares asociadas a los conos por la posición de su soma (muy cercano a la OPL) y por la longitud de sus axones, que descienden a lo largo de la IPL. A diferencia de las bipolares de cono, las células bipolares de bastón no tienen contacto directo con las células ganglionares, y se conectan con dos células amacrinas, una de tipo AII (glicinérgica) y otra de tipo Gabaérgica (Masland, 2001).

Las células horizontales y las células amacrinas son interneuronas inhibitoras que se ramifican de manera extensa en ambas capas plexiformes, las células horizontales en la OPL y las células amacrinas en la IPL. Llevan a cabo el procesamiento lateral de la información al regular la liberación de glutamato (Daw, *et al.*, 1989). En la OPL los fotorreceptores hacen contacto sináptico tanto con las células horizontales como con las células bipolares en estructuras llamadas tríadas. Adicionalmente, las células horizontales se comunican entre sí por medio de uniones comunicantes. Las células horizontales juegan un papel importante en la generación de contrastes, ya que su estimulación resulta no sólo en la inhibición del cono excitado sino en la de los conos vecinos, lo que se traduce en la estimulación únicamente de aquellas células ganglionares que se encuentran directamente debajo del área estimulada. A éste fenómeno se le denomina organización centro-periferia (Massey y Maguire, 1995).

Las células amacrinas juegan un papel muy importante tanto en la modulación lateral de la neurotransmisión como en la vía de señalamiento a partir de los bastones. Se ha descrito hasta la fecha 29 tipos de células amacrinas cuyas propiedades

morfológicas y fisiológicas son diferentes (Masland, 2001). Estas células establecen contacto sináptico tanto con las células bipolares y ganglionares como con otras células amacrinas en la capa plexiforme externa. A diferencia de las células horizontales cuya función es general, las células amacrinas llevan a cabo tareas especializadas relacionadas con el control y la modulación de las respuestas de las células ganglionares. Se ha determinado que las células amacrinas superan en número a las células horizontales en proporción de 4:1, y a las ganglionares en proporción de 15:1. Las células amacrinas están involucradas en la sincronización de los disparos de las células ganglionares, en el ajuste de la respuesta a los cambios en la intensidad de la luz y en los circuitos que detectan movimiento, entre otras funciones (Masland, 2001).

Las células ganglionares son un punto convergente de la información proveniente de las células bipolares, amacrinas y otras células ganglionares. Los potenciales de acción generados por las células ganglionares se propagan a través del nervio óptico hasta el núcleo geniculado lateral y el colículo superior, que constituyen el primer relevo hacia la corteza visual.

Las células ganglionares son tanto morfológica como fisiológicamente diversas; se han descrito de 10 a 15 tipos con diferencias morfológicas tanto en el tamaño de su soma como de su árbol dendrítico. Establecen sus conexiones en la capa plexiforme interna (IPL), y son las únicas células de la retina que disparan trenes de potenciales de acción, codificando así la información procedente de los fotorreceptores. Funcionalmente se clasifican en células "ON" (disparan en respuesta a la luz), "OFF" (disparan al terminar un estímulo luminoso), y "ON/OFF" (se activan tanto al inicio como al término del estímulo luminoso); éstas últimas están involucradas en la detección de movimiento y son capaces de identificar la dirección y velocidad del mismo (Masland, 2001). Las células ganglionares tienen funciones muy variadas como son, la integración de la información proveniente de conos estimulados por luz a diferentes longitudes de onda, indispensable para la visión a colores; la detección de movimiento, e incluso la regulación de los ritmos circadianos. Las conexiones sinápticas en la IPL están organizadas de manera que las células ganglionares pueden comparar la información proveniente de dos conos, es decir, la misma célula

ganglionar puede ser estimulada por la activación de un cono "S" e inhibida por la de un cono "L". Este arreglo celular le permite a la retina integrar señales provenientes de todo el espectro de luz visible, lo que hace posible la visión a color (Masland, 2001). La detección de movimiento se lleva a cabo por células ganglionares especializadas que se denominan células ganglionares sensibles al movimiento (DSGC) que pueden ser de tipo "ON" u "ON/OFF". Éstas responden preferencialmente a estímulos que se mueven hacia uno de los cuatro puntos cardinales (dirección preferida) y no responden a estímulos que se mueven en dirección contraria a la dirección preferida (dirección nula). Las DSGC se conectan con células amacrinas de tipo "starburst", cuya función es la inhibición de las DSGC observada en la dirección nula, mediante la liberación de GABA (ácido γ -aminobutírico) (Masland, 2001). Recientemente se encontró que algunas células ganglionares contienen un fotopigmento llamado melanopsina que les permite detectar la luz directamente. Las respuestas a la luz de estas células, a diferencia de las observadas por estimulación a partir de los fotorreceptores son muy lentas y no permiten detectar variaciones en la intensidad de la luz, lo que las hace poco apropiadas para la codificación de imágenes. Los axones de estas células se proyectan hacia el núcleo supraquiasmático y parecen estar directamente involucradas en la regulación de los ritmos circadianos (Hattar, *et al.*, 2003).

La retina de las aves es un modelo que ofrece grandes ventajas para su estudio: contiene un solo tipo de células gliales, las células de Müller; a diferencia de la retina de los mamíferos, la de las aves posee aproximadamente el mismo número de conos que de bastones, es avascular y carece de células endoteliales y elementos sanguíneos; además, las retinas de pollos de edad temprana pueden continuar su desarrollo *in vitro* en condiciones de cultivo relativamente simples (Adler y Farber, 1986).

Desarrollo de la retina

El ojo se forma a partir del neuroectodermo en una etapa temprana del desarrollo embrionario (Hamburger y Hamilton, 1951). En el pollo es posible distinguir desde la etapa de somita-10 (33-38 hrs. de incubación) las dos partes del tubo neural que

darán origen a los ojos. Las estructuras oculares primordiales surgen del prosencéfalo, se extienden lateralmente hacia la epidermis del embrión y generan las vesículas ópticas cuyas conexiones con el tubo neural se transforman en los tallos oculares (Mey y Thanos, 2000). La invaginación de las vesículas genera una estructura bilaminar que se conoce como copa óptica en la etapa de somita-18 (en el día E3 en el pollo; Hamburger y Hamilton, 1951). La retina neural se deriva de un engrosamiento de la capa interna de la copa, en tanto que la capa externa formará la esclera, la coroides y el EPR. Una vez formado el neuroepitelio que dará origen a la retina, las células entran en un periodo activo de proliferación. Alrededor del día E5, la actividad mitótica disminuye en una pequeña área central, donde comienza el proceso de diferenciación neuronal. Este periodo concluye en E8 cuando la mayor parte de las células en división quedan confinadas a la periferia. Entre E7 y E8 la retina pasa de la fase de proliferación celular a la fase de diferenciación. Las primeras células en diferenciarse son las células ganglionares seguidas por los fotorreceptores, y sucesivamente por las células de Müller, amacrinas, horizontales y bipolares. Es importante mencionar, sin embargo, que hay sobreposición en el proceso de diferenciación de los distintos tipos celulares (Mey y Thanos, 2000).

A nivel morfológico, la diferenciación neuronal se caracteriza por movimientos migratorios de los cuerpos celulares y la extensión de neuritas. Estos procesos celulares transforman la retina de un neuroepitelio pseudoestratificado en un órgano multilaminado cuyas capas terminan de establecerse alrededor de E16. La formación de los distintos estratos de la retina comienza en E6 y prosigue hasta E18. Puesto que la proliferación de neuroblastos se lleva a cabo en el borde externo de la retina embrionaria, las células postmitóticas deben migrar para alcanzar su posición definitiva en la retina. La migración celular, a diferencia de lo que se observa en otras estructuras del SNC, no depende exclusivamente del apoyo de las células gliales. Se ha sugerido que las células extienden prolongaciones hacia la superficie del cuerpo vítreo, a través de las cuales el núcleo se desplaza hasta alcanzar su posición final. Una vez que la migración ha concluido los procesos se retraen (McLoon y Barnes, 1989). Las primeras sinapsis en la IPL se forman en E13, entre las células amacrinas y las células ganglionares, mientras que las sinapsis entre los fotorreceptores y las

células bipolares en la OPL, se establecen posteriormente al E17 (Mey y Thanos, 2000). La formación de las subláminas a y b en la IPL, es un proceso tardío debido a que las células bipolares son las últimas en diferenciarse. El proceso de subestratificación comienza antes de que se establezcan contactos entre estas células y las células ganglionares, sin embargo en los mamíferos concluye después del nacimiento ya que requiere de estimulación visual (Chalupa y Gunhan, 2004).

La neurotransmisión se inicia en la retina alrededor del periodo en el que las células ganglionares y amacrianas establecen las primeras conexiones, antes de que los fotorreceptores alcancen la madurez. En el pollo, los primeros potenciales evocados por receptores glutamatérgicos se registran en E13 (Sugioka, et al., 1998), sin embargo la respuesta normal a la luz se desarrolla entre E17 y P3, ya que la formación sináptica de la OPL se alcanza en E18 (Hanawa, *et al.*, 1976, Mey y Thanos, 2000). La actividad sináptica temprana de las células ganglionares y amacrianas juega un papel muy importante en el establecimiento de conexiones y la reorganización de las células blanco en el tectum y el núcleo istmo-óptico. En la mayor parte de las áreas del sistema visual, un número considerable de neuronas muere por apoptosis durante el periodo en el que se establecen conexiones con la retina. El núcleo istmo-óptico se conecta con la retina entre E10 y E12, particularmente con las células amacrianas. La precisión de las conexiones istmo-retinales se lleva a cabo mediante el refinamiento de los árboles dendríticos y por medio de la eliminación de células en posiciones ectópicas, por procesos apoptóticos (Mey y Thanos, 2000). Asimismo, entre E11 y E16, aproximadamente, una tercera parte de las células ganglionares muere por apoptosis durante el proceso de conexión con el tectum óptico (Hughes y McLoon, 1979). Esta eliminación parece estar influenciada por señales del tectum, como son factores neurotróficos y la actividad sináptica (Frade, et. al. 1997; Goodman y Shatz, 1993).

Fisiología de la retina

Estudios farmacológicos y electrofisiológicos han demostrado que el glutamato es el principal neurotransmisor en la vía vertical de la retina, que va de los fotorreceptores a las células ganglionares. Los dos neurotransmisores inhibidores más importantes

son el GABA y la Glicina (Gly), secretados por las células horizontales y amacrinas, respectivamente. Adicionalmente, se ha identificado que las células amacrinas liberan además de glicina, dopamina, péptidos y acetilcolina, que podrían jugar un papel importante en la neurotransmisión en la retina (Masland, 1988).

Los aminoácidos excitadores median la transmisión sináptica en la vía vertical de la retina a través de varios subtipos de receptores de glutamato (López-Colomé, 1986, Massey y Miller, 1990). Los fotorreceptores reciben los estímulos visuales, y transmiten la información a las células bipolares usando al glutamato como transmisor. En la oscuridad los fotorreceptores están relativamente despolarizados, lo que implica una liberación tónica de glutamato en estas condiciones. En presencia de luz, el fotorreceptor se excita, induciendo un cambio conformacional en las opsinas; en los bastones el 11-cis-retinal en la rodopsina se transforma en todo-trans-retinal. Este cambio conformacional en las opsinas a su vez activa a una proteína G, la transducina, que está acoplada a una fosfodiesterasa que al activarse hidroliza cGMP. La caída en los niveles de cGMP es la responsable del cierre de canales de Na^+ con la consiguiente hiperpolarización y la disminución de la liberación de L-Glu de los fotorreceptores.

La detección de contrastes visuales es un proceso importante que ocurre al nivel de las células bipolares. Las diferencias en respuesta al mismo estímulo se deben a diferencias en los receptores de glutamato expresados por las células ON y OFF. Las células bipolares ON poseen receptores de tipo metabotrópico (mGluR6) que, en presencia de glutamato (oscuridad) activan a una fosfodiesterasa que disminuye los niveles de cGMP, de manera similar a lo que ocurre en los fotorreceptores. En condiciones luminosas, se deja de liberar glutamato, lo que inactiva a la fosfodiesterasa; consecuentemente, se eleva la concentración de cGMP, se abren los canales de Na^+ , y la célula se despolariza (Barnstable, 1993). En contraste, las células bipolares OFF poseen en la postsinapsis receptores de AMPA/KA que en condiciones luminosas, en ausencia de glutamato, cierran sus canales e inducen una hiperpolarización (DeVries, 2000). De esta manera, en el canal "ON", la despolarización de las células bipolares se traduce en la liberación de glutamato y la despolarización de las células ganglionares "ON", que como respuesta a la luz

aumentan su frecuencia de disparo. En el canal "OFF" la hiperpolarización de las células bipolares induce una disminución en la liberación de neurotransmisor con la consiguiente disminución en la frecuencia de disparo de las células ganglionares "ON". En condiciones escotópicas (de poca luz) los bastones se hiperpolarizan disminuyendo la liberación de glutamato hacia las células bipolares de bastón. Éstas, al igual que las células bipolares "ON" de cono, también expresan mGluR6, por lo que se despolarizan como respuesta. Sin embargo, a diferencia de otras células bipolares, las de bastón se conectan con células amacrinas de tipo AII y no con células ganglionares directamente. Las células AII se despolarizan como respuesta a la luz y establecen además contactos sinápticos con las células bipolares de cono "OFF", liberando glicina que inhibe esta vía a nivel ganglionar. Por otra parte, las células AII a través de uniones comunicantes con las células bipolares de cono ON inducen una despolarización en las bipolares propagando una señal positiva hacia las células ganglionares (Masland, 2001).

Como se mencionó anteriormente, las células ganglionares presentan una gran diversidad en su morfología y función. El tamaño del árbol dendrítico y la localización de sus ramificaciones en la capa plexiforme interna están altamente relacionados con su función. Para entender la fisiología de las células ganglionares es necesario introducir el término "campo receptivo". Éste se define como el área de la retina en la cual la actividad de una neurona puede ser influenciada por la luz. De esta manera, el campo receptivo de una célula ganglionar es el área de la retina donde la iluminación de un fotorreceptor aumenta o disminuye su tasa de disparo. Los campos receptivos de las neuronas de la retina son circulares, de manera que aquellas que responden a un centro luminoso se denominan "ON-center", en tanto que las que responden a un centro oscuro se denominan "OFF-center". Adicionalmente, aquellas células que responden selectivamente al encendido y el apagado de un estímulo luminoso (ON/OFF) están involucradas en la detección de movimiento y son sensibles tanto a la velocidad como a la dirección del estímulo luminoso.

Las células ganglionares expresan una gran variedad de receptores para neurotransmisores, tanto excitadores (acetilcolina y glutamato) como inhibidores (GABA y glicina). Los receptores glutamatérgicos, principalmente los de tipo

AMPA/KA y NMDA, juegan un papel crucial en la fisiología de estas células pues el influjo de Ca^{++} a través de los mismos interviene en una gran variedad de procesos intracelulares, por lo que están directamente relacionados con la muerte por excitotoxicidad en patologías como el glaucoma y la isquemia (Sucher, *et al.*, 1997). Cabe mencionar que la mayor proporción de los receptores de NMDA expresados en la retina se encuentra en las células ganglionares (Fletcher, *et al.*, 2000).

Los receptores de tipo NMDA en la neurotransmisión excitadora en la retina.

La codificación de los estímulos visuales en la retina está mediada tanto por la presencia como por la ausencia de glutamato en los espacios sinápticos de la retina. Es por esto que la cinética de las respuestas de las neuronas de segundo y tercer orden debe reflejar de manera fiel los cambios en la liberación de glutamato por parte de los fotorreceptores. La respuesta a los cambios en la concentración de neurotransmisor en la postsinapsis se regula por medio del control de la actividad de los receptores. En la vía ON, mGluR6, que se expresa exclusivamente en la retina, confiere a las neuronas la habilidad de despolarizarse al término de la estimulación con L-Glu. Los receptores ionotrópicos a glutamato también presentan características en la retina, que no se observan en otras regiones del SNC. La mayor parte de los receptores de AMPA en el cerebro, así como en las células horizontales y algunas células ganglionares, contienen subunidades GluR2 con baja permeabilidad al calcio (editados); sin embargo, las células bipolares OFF y algunas células ganglionares tienen receptores con mayor sensibilidad al Ca^{++} , ya que no están editados en el sitio Q/R. Adicionalmente, la expresión de variantes "flip", que se desensibilizan más lentamente, le permite a las células de la retina responder de manera tónica a la liberación de glutamato (Thoreson y Witkovsky, 1999).

Los receptores de tipo NMDA, también difieren en forma importante a los descritos en el cerebro. Se ha demostrado que existen diferencias en la unión de antagonistas del sitio del glutamato como el CPP y el MK-801; el sitio de la glicina también es distinto, puesto que antagonistas del mismo como el 7-CK, y el ACEA-1021 (5-nitro-

6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalina-2,3-diona) no modifican significativamente la unión de glicina (co-agonista de los receptores de NMDA) (López-Colomé y Somohano, 1992) (Rodríguez-Contreras, *et al.*, 1998). Estas diferencias podrían explicar por qué en la retina el 7-CK no protege a las neuronas de la muerte por isquemia como ocurre en el SNC (Lombardi y Moroni, 1994). Asimismo, la modulación por poliaminas del NMDAR en la retina también es diferente al cerebro: Se ha observado que en la retina las poliaminas inhiben la unión de glicina, en tanto que en el cerebro potencian el efecto de este aminoácido (Calderón y López-Colomé, 1998).

Estudios electrofisiológicos recientes demuestran que existen diferencias en las propiedades de los receptores para NMDA en los distintos tipos celulares de la retina interna (Sun, *et al.*, 2003), y se ha sugerido que estas diferencias podrían atribuirse a diferencias en la composición heteromérica de los receptores. Sin embargo, la variedad en las propiedades electrofisiológicas de los NMDARs podría también ser atribuida a diferencias en la densidad de los receptores, o a modificaciones postraduccionales, como su estado de fosforilación.

Expresión de subunidades de los NMDARs en la retina.

Actualmente no se conoce con precisión la composición heteromérica de los NMDARs en la retina, sin embargo, se ha estudiado la localización de las subunidades en los distintos tipos celulares. La expresión de las subunidades de los NMDARs en la retina de los mamíferos se ha estudiado mediante técnicas de hibridación *in situ* (Brandstätter, *et al.*, 1994, Watanabe, *et al.*, 1994) e inmunohistoquímica (Fletcher, *et al.*, 2000, Gründer, *et al.*, 2000) y se han obtenido resultados contradictorios. Utilizando la técnica de hibridación *in situ* se identificó el mRNA de la subunidad NR1 en todas las neuronas de la capa nuclear interna (INL) y en la de células ganglionares (GCL). La expresión de las subunidades NR2 es más discreta y no se distribuye tan ampliamente como NR1 (Brandstätter, *et al.*, 1998). En contraste, utilizando inmunohistoquímica se determinó la expresión de las subunidades del NMDAR además en la capa plexiforme externa (OPL). Estos estudios demostraron que las células horizontales expresan NR1 y NR2B (Gründer, *et al.*, 2000), y algunas células bipolares expresan NR1, NR2D y NR2C, aunque no

ha sido posible registrar respuestas de las células bipolares al NMDA en la retina completa (Thoreson y Miller, 1993). La inmunorreactividad a NR1 en la INL se atribuye principalmente a las células amacrinas en las cuales, el tratamiento con antagonistas de los NMDARs abate la respuesta a la luz (Dixon y Copenhagen, 1992). En esta línea, tanto las células amacrinas de tipo "starburst" como células amacrinas Gabaérgicas expresan NMDARs; en contraste, las células de tipo AII no responden al NMDA (Thoreson y Witkovsky, 1999).

Por otra parte, la mayor parte de las células ganglionares responden al NMDA, y el bloqueo de estos receptores por antagonistas resulta en respuestas transitorias a la luz, probablemente mediadas por los receptores de AMPA y KA. Es importante hacer notar que los NMDARs en la retina son poco sensibles al bloqueo por Mg^{++} (Lelong, *et al.*, 1992), propiedad que podría deberse a la inclusión de la subunidad NR2C en los heterómeros. Sin embargo, los NMDARs en estas células son probablemente muy heterogéneos, puesto que se ha observado que todas las subunidades NR2 (A-D) se expresan en las células ganglionares. Recientemente se demostró la expresión de la subunidad NR3a en la retina de roedores, principalmente en las células ganglionares y amacrinas, y al igual que en el cerebro, NR3a reduce las corrientes de Ca^{++} inducidas por NMDA (Sucher, *et al.*, 2003).

Es importante mencionar que la expresión de la subunidad NR2C sólo se ha demostrado en el cerebelo (Monyer, *et al.*, 1994) y en la retina (Gründer, *et al.*, 2000, Brandstätter, *et al.*, 1994). Sin embargo, las diferencias en las propiedades bioquímicas de los NMDARs de la retina con respecto a las descritas en el cerebro no dependen exclusivamente de la inclusión de la subunidad NR2C, ya que las características farmacológicas de los receptores NR1a/NR2C expresadas en sistemas heterólogos difieren de las observadas en la retina (Hollmann, *et al.*, 1993). Las propiedades específicas de los NMDARs de la retina, por tanto, podrían relacionarse con las variantes de empalme alternativo de NR1, mismas que determinan la actividad y las propiedades de los NMDARs heteroméricos (Zukin y Bennett, 1995) y constituyen un factor importante a considerar para la determinación del papel fisiológico de los NMDARs en este tejido. Sin embargo la expresión diferencial de las variantes de empalme alternativo de la subunidad NR1 en la retina

no ha sido estudiada. Dado que la composición oligomérica de los NMDARs de la retina se desconoce, la identificación de las variantes por empalme de NR1 en este tejido puede contribuir a explicar las propiedades específicas de estos receptores (López-Colomé y Somohano, 1992, Rodríguez-Contreras, et al., 1998, Calderón y López-Colomé, 1998).

El papel de los NMDARs en la maduración de los circuitos sinápticos de la retina.

El Glu juega un papel muy importante en el desarrollo del SNC, ya que no sólo funciona como neurotransmisor; también es un factor trófico relacionado con la división y la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario (DE) (Michaelis, 1998). Este aminoácido es de primordial importancia para el establecimiento de circuitos neuronales en la retina (lentile, *et al.*, 2001) por ser uno de los inductores del proceso de muerte celular programada. Además, se ha demostrado que la entrada de Ca^{2+} a través de los NMDARs induce la formación de óxido nítrico, que actúa como mensajero retrógrado en el proceso de consolidación de las conexiones sinápticas en el cerebro (Cogen y Cohen-Cory, 2000) y la retina (Anand, *et al.*, 1985, López-Colomé y López-Hernandez, 2003).

Una de las teorías más aceptadas acerca del desarrollo neural propone que las conexiones sinápticas presentes en el cerebro adulto son aquellas que han sobrevivido a un intenso proceso de competencia por el espacio sináptico. De acuerdo con esta teoría, las sinapsis que se activan repetidamente de manera sincrónica son aquellas que se fortalecen y sobreviven. El fortalecimiento sináptico requiere de la sincronización del proceso de liberación del neurotransmisor de la presinapsis con el proceso de activación de receptores y la consecuente entrada de Ca^{++} en la postsinapsis. Esta sincronización no sólo debe ser temporal, sino también fisiológica, es decir, se debe controlar tanto la concentración del neurotransmisor en la hendidura sináptica como la magnitud del influjo de Ca^{++} que resulta de la activación de los receptores (Scheetz y Constantine-Paton, 1994).

Durante el DE las neuronas reciben un pequeño número de estímulos cuya intensidad es débil debido a que existe poca sincronía entre los procesos pre y

postsinápticos. Estos estímulos, a pesar de su debilidad, deben activar a los receptores presentes en las neuronas jóvenes. Sin embargo, a medida que se refinan las conexiones sinápticas, se requiere regular, tanto la sensibilidad de los receptores a un mayor estímulo, como su permeabilidad iónica, ya que una despolarización continua o una elevación en la concentración intracelular de Ca^{++} puede resultar tóxica para las neuronas. Esto implica que las propiedades de los receptores en la membrana de las neuronas deben cambiar como consecuencia del estado de maduración de las sinapsis. Esto se ha observado en numerosas estructuras en el SNC: Tanto en el colículo superior como en la corteza visual las corrientes generadas por los NMDARs son mayores en las neuronas jóvenes que aquellas generadas en el estado adulto (Hestrin, 1992); también en el hipocampo se ha demostrado que existen diferencias en la sensibilidad al Mg^{++} a lo largo del DE (Morrisett, *et al.*, 1990). La sensibilidad a la glicina es otra propiedad de los NMDARs que cambia como consecuencia de la maduración del tejido (Kleckner y Dingledine, 1991).

Durante el DE de la retina, la unión específica de NMDA y AMPA/KA a sus receptores cambia con respecto al tiempo. Se demostró que existe una mayor unión de los ligandos específicos para los receptores de AMPA/KA durante los primeros días del desarrollo, mientras que la unión de los ligandos correspondientes a los receptores de NMDA se incrementa al término del período embrionario (Somohano, *et al.*, 1988). A este respecto, Subramaniam y colaboradores, empleando bloqueadores de canal abierto de los receptores de tipo NMDA, observaron un incremento en la unión del bloqueador MK801 a medida que transcurren los días postnatales (Subramaniam y McGonigle, 1994). Adicionalmente, antagonistas como el APV y el α -amino-adipato incrementan su capacidad de desplazamiento (López-Colomé y Somohano, 1989), y existen diferencias farmacológicas en cuanto a las características del sitio de la glicina en la retina (Boje, *et al.*, 1992).

En el desarrollo de la retina las primeras corrientes de Ca^{++} intracelular evocadas por el receptor de NMDA, se observan en el periodo en el que comienza a estratificarse la retina, aunque los primeros potenciales no se registran sino hasta que este período ha concluido y se presentan las primeras sinapsis en la capa plexiforme

interna (Sugioka, *et al.*, 1998). Una vez que concluye el período de estratificación comienza el período crítico del refinamiento de las sinapsis. En la retina de mamíferos la remodelación dendrítica y la formación de estratos funcionales está dictada por actividad sináptica en la que los receptores de NMDA juegan un papel importante (Goodman y Shatz, 1993). La apoptosis mediada por estos receptores es esencial en la remodelación de las sinapsis en la retina en esta etapa, ya que es en este período cuando se establecen las conexiones entre las células amacrinas y el núcleo istmo-óptico (Clarke, 1992).

Como se mencionó anteriormente, las propiedades farmacológicas y electrofisiológicas de los NMDARs están dictadas por el tipo de subunidades que contienen. Por lo tanto, los cambios en las propiedades de los receptores que ocurren durante el DE de la retina, podían derivar no sólo de un aumento en el número de receptores expresados en la membrana, sino de cambios en las isoformas de NR1 que se generan por empalme alternativo, o cambios en la expresión de las subunidades NR2, que afectan las propiedades del canal (Laurie y Seeburg, 1994, Laurie, *et al.*, 1995, Prybylowski y Wolfe, 2000). En la retina, la heterogeneidad de los receptores sinápticos es un factor clave para la generación de propiedades funcionales específicas en los distintos tipos de neuronas, lo que enfatiza la importancia de la identificación de las isoformas específicas de NR1 y NR2 que se expresan, así como sus variaciones durante el proceso de DE.

El perfil de expresión de las subunidades del NMDAR en el DE sólo ha sido estudiado en roedores (Watanabe, *et al.*, 1994, Gründer, *et al.*, 2000). En estos estudios se demostró que la expresión de NR1 se inicia en etapas tempranas del desarrollo de la retina y aumenta progresivamente. Es importante mencionar que en ambos estudios se utilizaron sondas o anticuerpos que reconocen a todas las variantes de NR1, sin definirse las variantes de empalme alternativo. En el caso de las NR2 se observó que en etapas tempranas del DE se expresa primordialmente NR2B, en tanto que en etapas tardías se expresa NR2A (ver Tabla II). Los resultados de ambos estudios son contradictorios en cuanto a los perfiles de expresión de NR2C y de NR2D. En tanto que en el ratón NR2C no se expresa y NR2D lo hace transitoriamente, en la retina de rata se identificó tanto la expresión de NR2C como la de NR2D desde las

etapas tempranas hasta el estado adulto, y su niveles de expresión son, en general, muy bajos.

Tabla II. Perfil de Expresión del NMDAR

A. Retina de ratón (mRNA)

Días de desarrollo	E13	E14	P1	P7	P14
NR1	*	**	***	****	****
NR2A				***	****
NR2B	*	**	***	****	****
NR2C	No se detectó su expresión en el periodo estudiado				
NR2D			*	*	

Watanabe.M, et. al. (1994)Brain. Res. 634:328-332

B. Retina de Rata (Proteína)

Días de desarrollo	P3	P9	P19	Adulto
NR1	*	**	***	****
NR2A	*	**	**	***
NR2B	*	**	***	****
NR2C		*	**	***
NR2D	****	***	**	**

Gründer et. al. (2000) J. Neurobiol. 44: 333-342

Estos resultados sugieren que durante las primeras etapas del DE de la retina se expresan receptores de alta afinidad por glutamato capaces de inducir grandes corrientes de Ca^{++} , que permiten a las neuronas responder a estímulos lejanos a la vez que consolidan las repuestas postsinapticas. A medida que se establecen y se refinan las conexiones, ya no es indispensable que la afinidad por el glutamato sea tan alta puesto que las distancias desde los sitios de liberación son menores y la cantidad de Glu que se libera está modulada por procesos retrógrados; además la

expresión de NR2A le confiere a los receptores una permeabilidad iónica menor, lo que protege a las neuronas del daño excitotóxico.

El papel del NMDAR en condiciones patológicas de la retina.

La activación de los receptores a glutamato en condiciones patológicas es un evento que poseen en común diversas enfermedades neurológicas como la epilepsia, la enfermedad de Huntington, la de Parkinson y la de Alzheimer, entre otras (Michaelis, 1998). Es posible que algunos padecimientos oculares y de la retina como son el glaucoma, la retinosis pigmentaria, la retinopatía diabética, las oclusiones arteriales o venosas, la neuropatía isquémica óptica, la neuritis óptica, y el trauma en el nervio óptico involucren toxicidad mediada por receptores a glutamato (Sucher, et al., 1997). Adicionalmente, padecimientos sistémicos como la enfermedad de Alzheimer y la demencia asociada a HIV están relacionados con daño en la capa de células ganglionares (Hinton, et. al. 1986, Tenhula *et. al.* 1992). Es interesante notar que el blanco preferente del daño excitotóxico en la retina son las células ganglionares (RGCs). Estas células expresan, como se mencionó anteriormente, una gran variedad de receptores a neurotransmisores, sin embargo, los iGluRs juegan un papel determinante en la patología debido al control que ejercen sobre la concentración intracelular de Ca^{++} . A este respecto se ha determinado que la entrada de Ca^{++} inducida por glutamato en las RGCs es controlada en gran medida por los NMDARs. Adicionalmente, el aumento en la concentración intracelular de Ca^{++} mediado por los NMDARs induce la activación de los canales de Ca^{++} sensibles a voltaje tipo L (LVSCC); es por esto que las dihidropiridinas, agonistas de estos canales, atenúan la toxicidad del L-Glu y se usan en el tratamiento terapéutico de los padecimientos antes mencionados (Sucher, et al., 1997) .

El incremento intracelular de Ca^{++} mediado por los NMDARs promueve la activación de cascadas de señalamiento que conducen a la muerte celular, pero ésta no es la única vía involucrada en la muerte desencadenada por estos receptores. Se ha reportado que el NMDA induce la activación de la sintasa del óxido nítrico (NOS) (Dawson, *et al.*, 1993, López-Colomé y López-Hernandez, 2003). La neurotoxicidad

del NO está mediada por la generación de peroxinitrito (ONOO^-) formado por la reacción del NO con el ión superóxido (O_2^-). El papel de la NOS en la retina se ha estudiado por medio de ratones transgénicos, en los que se observa que los mutantes que carecen de esta enzima presentan una reducción del 30% en la muerte inducida por NMDA al compararlos con los ratones silvestres (Vorwerk, *et. al.* 1997).

El glaucoma es una enfermedad asociada con cambios en los campos visuales y se considera como una neuropatía óptica caracterizada por una pérdida progresiva de las RGCs. Existe evidencia tanto histológica como electrofisiológica de que estas células son las únicas células de la retina afectadas por esta enfermedad. El tratamiento convencional consiste en disminuir la presión intraocular, ya que la hipertensión conduce a un aumento en la concentración de glutamato en el humor vítreo, que es responsable del daño isquémico. La sensibilidad de las RGCs parece estar mediada por los NMDARs, por lo que además de los agentes que reducen la presión intraocular, actualmente se estudia el efecto terapéutico de antagonistas de los NMDARs como la memantina (Heft, *et al.*, 2003). Este bloqueador de canal abierto, a diferencia del MK801(+) no inhibe totalmente las corrientes inducidas por glutamato, por lo que presenta menos efectos secundarios. Adicionalmente, se estudia el efecto del betaxolol, un beta-bloqueador utilizado para reducir la presión intraocular, pero que además es un antagonista de los LVSCC (Osborne, *et al.*, 1999).

La retinopatía diabética es una complicación común de la diabetes y representa una de las causas más importantes de ceguera. Está caracterizada por un incremento en la permeabilidad vascular, pérdida de la barrera hematorretiniana, y degeneración macular. Existe evidencia de que el daño neuronal observado en esta enfermedad se debe a una elevación de la concentración de glutamato en el humor vítreo (Barber, 2003). Este aumento podría deberse a que en la diabetes se encuentra comprometido el metabolismo del glutamato, lo que reduce la habilidad de las células de Müller para convertir el glutamato en glutamina y de oxidarlo en α -cetoglutarato. Aunado al déficit metabólico, se ha sugerido que la actividad de los transportadores se encuentra disminuida, lo que resulta en un aumento de la concentración extracelular de glutamato. Al respecto, se ha observado que ratones diabéticos *ob/ob*

presentan un incremento en la unión de NMDA y AMPA a sus receptores en la médula espinal. No se ha determinado si en la retina del paciente diabético el número o las propiedades iGluRs están alterados, sin embargo estos cambios podrían ser la causa del incremento en la muerte neuronal observada (Barber, 2003). Al igual que en la retinopatía diabética, en la retinosis pigmentaria se han reportado cambios en el metabolismo del glutamato. Este padecimiento, a diferencia de los mencionados anteriormente, afecta principalmente a las células del EPR que son incapaces de fagocitar los segmentos externos de los fotorreceptores; por lo que la acumulación de los discos y desechos celulares en la parte posterior de la retina conduce a la muerte de los fotorreceptores. Sin embargo, estudios recientes sugieren que alteraciones en el metabolismo de glutamato en las células de Müller son anteriores a la pérdida de fotorreceptores, por lo que estas deficiencias podrían ser las responsables, por lo menos en parte, de la degeneración y la muerte celular observada en este padecimiento. A este respecto se ha demostrado que tanto el transporte de glutamato (Fletcher, 2000) como la expresión de NR1 (Gründer, *et al.*, 2001) se encuentran alterados en las células de Müller, por lo que éstas podrían ser más importantes en la etiología de la retinosis pigmentaria, de lo que originalmente se planteó.

OBJETIVOS

En la retina, la heterogeneidad de los receptores sinápticos es un factor clave para la generación de propiedades funcionales específicas en las neuronas. La activación de los NMDARs juega un papel muy importante tanto en el establecimiento de las conexiones sinápticas, como en la codificación de estímulos para su transmisión hasta el cerebro. Los NMDARs juegan un papel muy importante en el procesamiento de información y el desarrollo del sistema visual, y están involucrados en la muerte por excitotoxicidad en enfermedades como el glaucoma, la oclusión vascular, la neuropatía óptica y la isquemia. Puesto que los NMDARs de la retina tienen propiedades farmacológicas distintas de las descritas en el SNC, resulta muy relevante para efectos clínicos, determinar la composición oligomérica de los NMDARs en los distintos tipos celulares de la retina, puesto que son las distintas subunidades del NMDAR las que le confieren estas particularidades. Es por esto que el primero objetivo de este trabajo fue:

- I. *Investigar si las diferencias bioquímicas y farmacológicas entre los NMDARs de la retina y los del SNC se relacionan con la expresión diferencial de variantes de empalme alternativo de la subunidad NR1 o expresión diferencial de NR2 en la retina.*

La variación de los NMDARs durante el DE de la retina puede servir como modelo para el estudio y análisis de los mecanismos que controlan el recambio de subunidades del NMDAR y consecuentemente el ajuste de sus propiedades a los cambios genéticos y epigenéticos que caracterizan la plasticidad durante el DE y el SN diferenciado. El análisis de los mecanismos que regulan los cambios en la expresión de estos receptores es un campo muy activo debido a que se han observado diferencias en la composición de los receptores en padecimientos que van desde el trauma en el nervio óptico (Kreutz, *et al.*, 1998) hasta la enfermedad de Alzheimer (Bi y Sze, 2002). Además, puesto que los NMDARs juegan un papel muy importante en la muerte neuronal, resulta crucial entender los procesos que

gobiernan los cambios en los perfiles de expresión de estos receptores, para diseñar tratamientos farmacológicos efectivos. Es por esto que el segundo objetivo de este trabajo es:

II. *Determinar los cambios en la expresión de las variantes por empalme alternativo de NR1 y la variación en el perfil de expresión de NR2 durante el desarrollo embrionario de la retina.*

METODOLOGIA.

Extracción de RNA.

El método utilizado es una modificación del método de extracción con isotiocianato de guanidina. Se extrajo RNA total utilizando Trizol® (Invitrogen), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se utilizó la retina o el cerebro de pollos de 3 días de edad. Como control se utilizó tejido de ratas Sprague-Dawley adultas sacrificadas por decapitación. Los estudios durante el desarrollo embrionario se llevaron a cabo en retinas de embrión de pollo de 8, 10, 13, y 17 días (E8, E10, E13, E17). Las muestras de RNA se fraccionaron y almacenaron a -80°C hasta su uso. La concentración y pureza de las muestras se calculó por absorbancia a 260/280nm. La integridad de las muestras se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa con formamida (Sambrook y Russell, 2001).

Diseño de oligonucleotidos de DNA (“primers”).

Se utilizó el gen que codifica a la subunidad NR1 de la rata (No. de acceso Genebank L08228), puesto que se conoce bien la estructura del mismo; en las aves, el único cDNA descrito es el del pato (No. de acceso Genebank D83352). La alineación de la secuencia genómica (sólo los exones) de la rata con la secuencia de NR1 del pato sirvió como base para predecir las regiones que se procesan por empalme alternativo en el pollo, y permitió el diseño de oligonucleotidos de DNA usados como cebadores (“primers”) para monitorear, en la secuencia de pato, la expresión de los exones que en la rata se procesan alternativamente (5, 21 y 22), y un juego que identifica la expresión general de todas las isoformas de la NR1. Todos los oligonucleótidos se diseñaron sobre zonas de alta homología entre la secuencia de pato y la secuencia de rata, utilizando el programa MacVector 6.5.3 (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA), y se analizaron usando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para confirmar su especificidad.

Las subunidades NR2 constituyen una familia de genes con alta homología en una parte de la región N-terminal y las regiones transmembranales, y hasta la fecha no se han descrito secuencias de aves. Con objeto de diseñar “primers” específicos para cada subunidad que se unan a las secuencias de pollo, fue necesario determinar las

regiones que poseen alta homología entre especies, pero son específicas para cada isoforma. Se alinearon las secuencias tanto de aminoácidos como de nucleótidos correspondientes a las distintas NR2 para determinar las regiones de alta homología entre subunidades, y posteriormente para cada subunidad se alinearon las secuencias de las distintas especies disponibles en el banco de genes. Los “oligos” para NR2B y NR2D fueron descritos previamente (Itzstein y Espinosa, 2001). No se encontró en la literatura juegos de “primers” que cumplieran con los requisitos de especificidad para las subunidades NR2A y NR2C, por lo que éstos fueron diseñados utilizando el programa MacVector 6.5.3 (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA), y los resultados fueron analizados posteriormente por el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para confirmar su especificidad. Los distintos juegos de “primers” se listan en la Tabla III.

Análisis de los transcritos de NR1 y NR2 por RT-PCR.

El cDNA se sintetizó a partir de 2 µg de RNA total utilizando hexámeros al azar. Las muestras de RNA se incubaron a 70°C por 2 min y se agregó 40 pmol de los hexámeros. La síntesis se llevó a cabo a 42°C por 1 hr usando 100 U de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen Co.), excepto en el control negativo. Se incluyó, asimismo, 0.5 mM de cada dNTP y 10 U de inhibidor de RNAsas (Amersham-Pharmacia Biotech Inc., Piscataway NJ, USA). La solución amortiguadora contiene Tris-HCl 50 mM a pH 8.3; KCl 75 mM; MgCl₂ 3 mM; y DTT 10 mM. Posterior a la síntesis de cDNA, las muestras se incubaron con 0.2 U de RNasa H (Invitrogen Co.) por 30 min a 37°C. La mitad del producto de la reacción se amplificó con primers específicos para NR1 o NR2 y la otra mitad se empleó para amplificar β-actina. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando la siguiente mezcla de reacción: 2.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Co.); 0.4 µM de cada primer, 0.5 mM de cada dNTP y MgCl₂ (la concentración usada con cada juego de primers se lista en la Tabla I) en la solución amortiguadora recomendada por el fabricante (Tris-HCl 20 mM pH 8.4; KCl 50 mM) en un termociclador Eppendorff, (Waltham, MA). Las muestras se sometieron a 27 ciclos del protocolo: 94°C, 30 s; (la temperatura de unión de cada primer se lista en la Tabla I), 30s; 72°C, 45 s, y un

paso final de elongación a 72°C, 10 min. El número de ciclos se estableció haciendo una curva de amplificación para el gene de NR1 y para cada NR2. A 27 ciclos la curva de amplificación es lineal, lo que garantiza una relación proporcional entre la cantidad de mRNA presente en la muestra y la lectura densitométrica de los fragmentos amplificados por PCR separados en el gel. Se utilizó como control positivo un plásmido con NR1 de pato (donación del Dr. N. Kimura) o plásmidos con NR2A, NR2B, NR2C o NR2D de rata (donados por el Dr. S. Nakanishi). Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. Cada RT-PCR se repitió por lo menos tres veces; se muestran resultados representativos. El análisis densitométrico se llevó a cabo con el programa Kodak 1D ver.3.5.

Análisis Estadístico.

Las imágenes digitalizadas de los geles se analizaron mediante la normalización de la intensidad de cada banda correspondiente a NR1 o NR2 (medida en pixeles) dada por su relación con la banda correspondiente a actina. Este cociente indica los niveles de expresión de la muestra con respecto a actina (cuya expresión permanece constante durante el desarrollo). Posteriormente se sometieron a un análisis de varianza de una vía para determinar si los cambios observados son estadísticamente significativos

Análisis de la secuencia de los productos de RT-PCR.

Se demostró que los productos de PCR codifican para NR1 mediante la purificación de las bandas de los geles usando el Kit "Gene Clean III" (Bio 101 Inc, La Jolla, CA, USA) y su posterior secuenciación en un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Los resultados se analizaron por comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos del banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Los resultados de esta búsqueda se consideran significativos si su valor es <1 . En todos los casos las regiones amplificadas por RT-PCR resultaron altamente homólogas con receptores de tipo NMDA.

La alineación de secuencias se llevó a cabo usando el programa Clustal W (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>). La traducción de las secuencias se hizo con la herramienta de la página de "Justbio" (<http://www.justbio.com>) y el análisis de las secuencias de proteína predichas se realizó en el sitio PROSITE (<http://ca.expasy.org/cgi-bin/scanprosite>).

Análisis de las Isoformas de NR1 por Western Blot.

Las membranas de fracciones subcelulares de la retina de pollos de E13, E17 y P3 se obtuvieron mediante la técnica descrita anteriormente (López-Colomé y Lee, 1996). Brevemente: las retinas se homogeneizaron en sacarosa 0.3 M 10^{-4} M $MgSO_4$ y se fraccionó la muestra por centrifugación diferencial. La fracción nuclear cruda contiene las terminales sinápticas de los fotorreceptores y la fracción sinaptosomal cruda contiene las de la capa plexiforme interna. Los sinaptosomas de ambas fracciones se lisaron mediante una solución hiposmótica, y se obtuvo las membranas correspondientes mediante sedimentación por centrifugación a 45000 x g por 20 min. a 4 °C, y se congelaron por 48 hrs. La concentración de proteína total se midió por el método de Bradford.

La expresión de la proteína NR1 se demostró por Western Blot. Las muestras se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5%, seguida de electrotransferencia a membranas de PVDF (Hybond-P, Amersham). Se bloqueó la unión inespecífica de anticuerpos con una solución de leche 5% en TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5; NaCl 50 mM) por 1 hr. Posteriormente, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario correspondiente (dilución 1: 200) (Novus Biologicals, Littleton CO. USA) toda la noche a 4°C, se lavó tres veces con TTBS (Tween-20 al 0.05% en TBS) y se incubó por 2 hrs. con un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Inc.USA) en TTBS. Se reveló con diaminobenzidina (Sigma).

Tabla III. Primers usados en los ensayos de RT-PCR

Secuencia	Nombre	Número Acceso*	Sitio de unión	Temperatura de unión	Concentración de MgCl ₂
5'-GAGCATCCACCTGTCCTTTTTG-3'	855 (F)	D83352	Exon 4 NR1	56°C	1.66mM
5'-GGGGTCAAAGTGAAGCACTTTCTC-3'	1059 (R)	D83352	Exon 6 NR1	56°C	1.66mM
5'-GAGTATCCACCTGAGTTTCCTT-3'	826 (F)	L08228	Exon 4 NR1	56°C	1.66mM
5'-GGGTCAAAGTGCAGCACCTTCT-3'	1070 (R)	L08228	Exon 6 NR1	56°C	1.66mM
5'-ATGCTGGTGGCTGGAGGTATTG-3'	2908 (F)	D83352	Exon 19 NR1	56°C	1.66mM
5'-TAGGGTCAGGTTCTGCTCTACCAC-3'	3079 (R)	D83352	Exon 21 NR1	56°C	1.66mM
5'-GCTCATCAACGGGAAGAATGAATC-3'	1272 (F)	D83352	Exon 8 NR1	56°C	1.66mM
5'-CGACATCTGATAGCCTTGAGGTTTC-3'	1647 (R)	D83352	Exon 10 NR1	56°C	1.66mM
5'-CTTGGGTGAGGTATCAGGAGTG-3'	2828 (F)	D83352	Exon 19 NR1	56°C	1.66mM
5'-GAUGGAUGGCAGUACGUCAG-3'	3390 (R)	D83352	Exon 22 NR1	56°C	1.66mM
5'-GCCGTTAATGTGTGGAGGAA-3'	3016(F)	D83352	Exon 20 NR1	56°C	1.66mM
5'-AGCCTGTCTCTCTGGCACTC-3'	3197(R)	D83352	Exon 22 C2 NR1	56°C	1.66mM
5'-TGAACCTCTCAAGAATGGACTCACC-3'	NR2A(F)	NM_012573		57°C	3.5mM
5'-GCCACCTCTACTGTGTTAGGGTTG -3'	NR2A(R)	NM_012573		57°C	3.5mM
5'-ACTGTGACAACCCACCCTTC-3'	NR2BI(F)**	U11419		56°C	1.66mM
5'-CGGAAGTGGTCCAGGTAGAA-3'	NR2BI(R)**	U11419		56°C	1.66mM
5'-ACCCTGTACCAGCCACAGC-3'	NR2C(F)	NM_012575		62°C	1.66mM
5'-ACCCACTGTCCCTGTAGC-3'	NR2C(R)	NM_012575		62°C	1.66mM
5'-AAGAAGATCGATGGCTGCTG-3'	NR2DI(F)**	L31612		57°C	1.5mM
5'-GGATTTCCCAATGGTGAAGG-3'	NR2DI(R)**	L31612		57°C	1.5mM
5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCT-3'	β-actin			56°C	1.66mM
5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'	β-actin			56°C	1.66mM

F, delantero; R, reverso

* Número de acceso del banco de genes (GenBank)

** Itzstein y Espinosa, 2001.

RESULTADOS.

I. Expresión de NR1.

1. *Expresión general de las variantes de NR1.*

Análisis comparativo entre la retina diferenciada y el cerebro.

Se analizó la expresión total de NR1 en muestras obtenidas de la retina y el cerebro de pollo, comparadas con muestras equivalentes de tejido de rata, debido a que tanto la secuencia del gene, como sus patrones de expresión se conocen en la rata. Se diseñaron pares de "primers" con base en la secuencia del cDNA del NMDAR1 de pato (como se describe en "Métodos"), y en la secuencia genómica de la rata que aparecen en la Tabla III (Genbank accesión No. L08228). La amplificación mediante RT-PCR usando un juego de primers complementarios de los exones 8-10, que reconocen a todas las isoformas de NR1 demostró que no existe una diferencia significativa entre los dos tejidos (Figura 8A), de acuerdo con datos que demuestran la distribución homogénea de la subunidad NR1 en el sistema nervioso.

Estos resultados sugieren que las diferencias bioquímicas observadas entre los NMDARs de la retina y los del SNC no se deben al nivel total de expresión de NR1 y podrían derivar de la expresión diferencial de las variantes por empalme alternativo en ambos tejidos, o bien, en las subunidades NR2 que se expresan en la retina.

Análisis del perfil de expresión de NR1 en el desarrollo embrionario (DE) de la retina.

La expresión general de las isoformas del receptor de NMDA se analizó en la retina de embriones de pollo de 8, 10, 13 y 17 días de DE (E8, E10, E13, E17), así como en retinas de pollos de 3 y 21 días de edad (P3, P21). Se observó un incremento en la expresión de NR1 a partir de E8, que alcanza el nivel máximo en E17, mismo que se mantiene en la retina diferenciada (P3 y P21; Figura 8B). Este resultado coincide con el incremento de la unión específica de NMDA-H³ (Somohano, et al., 1988) así como de la potencia de los antagonistas competitivos del NMDAR entre E14 y E17 observada previamente (López-Colomé y Somohano, 1989).

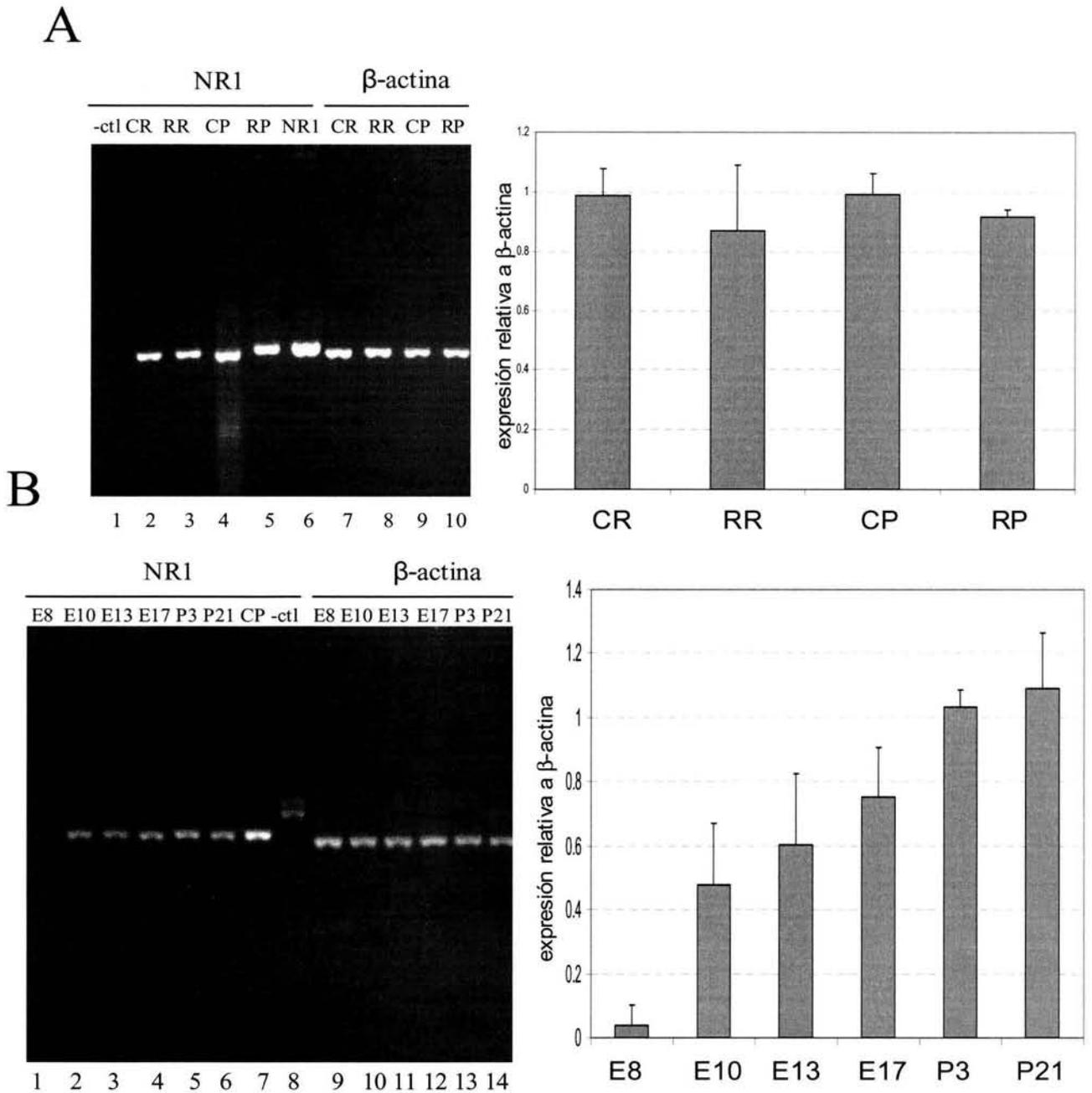


Figura 8. Expresión general de NR1. El perfil de expresión de NR1 se determinó por RT-PCR usando un juego de primers que amplifica una región común a todas las isoformas de NR1. **(A)** Comparación entre la retina madura y el cerebro. **(B)** Perfil de expresión durante el DE. Se amplificó mRNA de β -actina como control de expresión y se normalizaron los resultados como se menciona en los métodos. Las gráficas a la derecha corresponden al análisis densitométrico normalizado de los geles mostrados. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes. **A:** CR, cerebro de rata; RR, retina de rata; CP, cerebro de pollo; RP, retina de pollo; NR1, control positivo, plásmido que contiene NR1 de pato; -ctl, control negativo, amplificación de retina de pollo sin reverse transcriptasa. **B:** retinas de 8, 10, 13, y 17 días de DE; P3, retina de pollo de 3 días de nacido; P21 retina de pollo de 21 días de nacido

2. Expresión de las isoformas de NR1 por empalme alternativo del exón 5.

El empalme alternativo del exón 5 de la NR1 genera variantes con o sin el casete denominado N1, en el extremo N-terminal de la proteína. Este dominio está constituido por 21 aminoácidos, seis de ellos cargados positivamente. La presencia del casete N1 reduce la afinidad del receptor por los agonistas, y por antagonistas competitivos como el 2-amino-5-fosfonovalerato (APV) (Dingledine, et al., 1999). Los NMDARs que incluyen esta variante de NR1 son insensibles a la inhibición por protones, y no presentan potenciación de su actividad por poliaminas, ni por Zn^{++} (Durand, et al., 1992, Zukin y Bennett, 1995).

Para el análisis de la expresión de las isoformas de NR1 que contienen exón 5, que codifica para el casete alternativo N1 de la proteína, se diseñó un juego de "primers" complementarios de los exones 4 y 6, que flanquean la región de empalme. Con estos "primers" se generó mediante RT-PCR un fragmento de 263 pb que incluye el exón 5 y otro, de 200 pb, que carece del exón.

Análisis comparativo entre la retina diferenciada y el cerebro.

Como se observa en la Figura 9A, en la retina madura de pollo predomina la expresión de isoformas con exón 5, a diferencia del cerebro, donde predomina la expresión de NR1 sin este exón.

A este respecto, en la retina, los sitios de unión de los agonistas y antagonistas competitivos de los NMDARs, como el CPP (López-Colomé y Somohano, 1992), así como la modulación del sitio del coagonista glicina por las poliaminas (Rodríguez Contreras, et al., 1998, Calderón y López-Colomé, 1998), difieren significativamente de los del cerebro. Estos datos sugieren que las diferencias farmacológicas observadas en la retina podrían estar dictadas (por lo menos en parte) por la presencia de distintas isoformas de la NR1 de las que se expresan en el cerebro. Los resultados obtenidos concuerdan con estudios previos que demuestran diferencias bioquímicas y farmacológicas entre los NMDARs de la retina y el cerebro, que dependen de la(s) variante(s) por empalme de NR1 incluida(s) en el receptor.

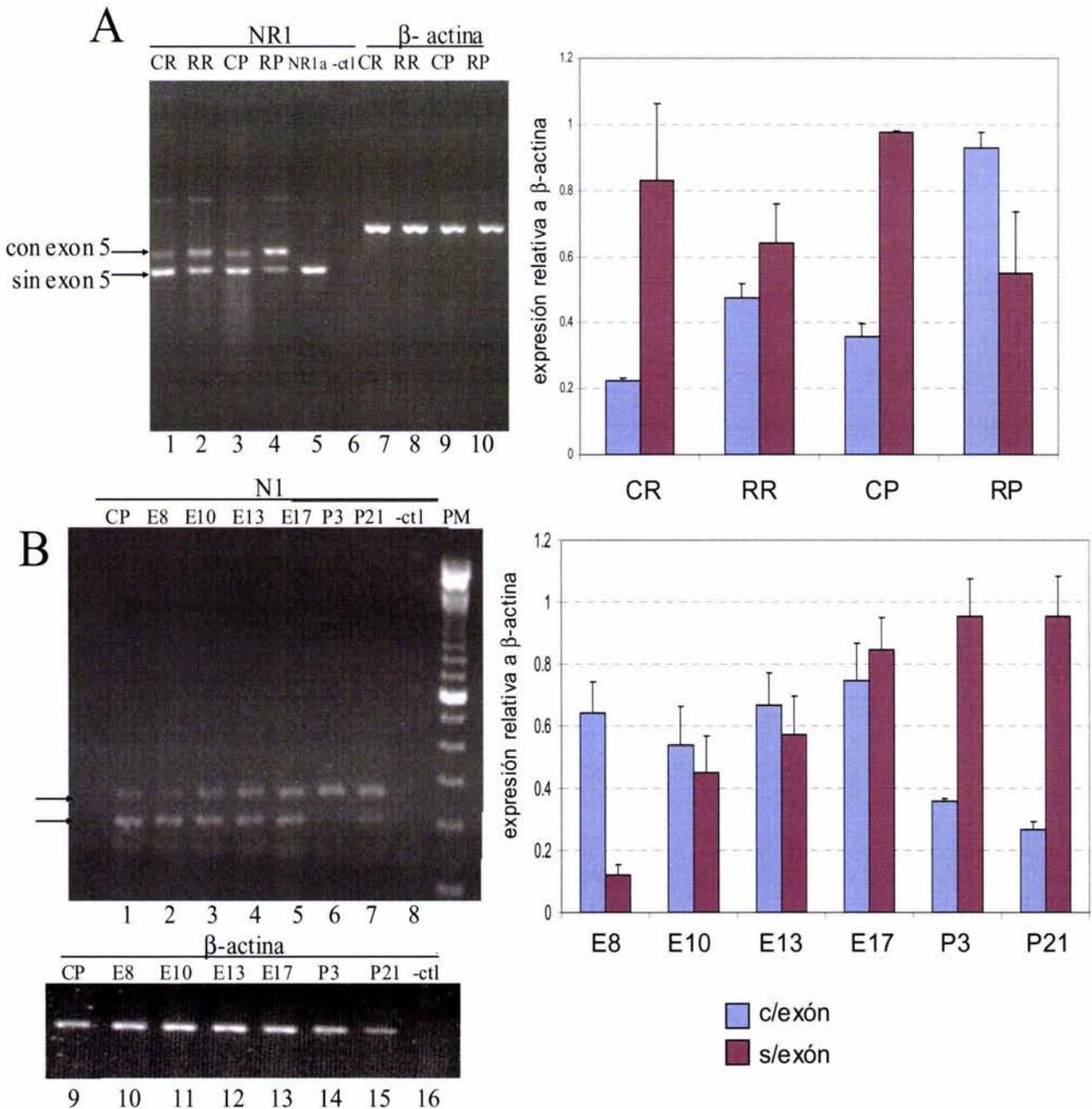


Figura 9. Expresión de las variantes de NR1 que contienen exon 5. El perfil de expresión de NR1 se determinó por RT-PCR usando un juego de primers que amplifica desde el exon 4 hasta el exon 6 flanqueando el exon que se procesa por empalme alternativo. **(A)** Comparación entre la retina madura y el cerebro. **(B)** Perfil de expresión durante el DE. Se amplificó mRNA de actina como control de expresión y se normalizaron los resultados como se menciona en los métodos. Las gráficas a la derecha corresponden al análisis densitométrico normalizado de los gels mostrados. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes. **A:** CR, cerebro de rata; RR, retina de rata; CP, cerebro de pollo; RP, retina de pollo; NR1, control positivo, plásmido que contiene NR1 de pato; -ctl, control negativo, amplificación de retina de pollo sin reverse transcriptasa. **B:** retinas de 8, 10, 13, y 17 días de DE; P3, retina de pollo de 3 días de nacidos; P21 retina de pollo de 21 días de nacidos

Análisis del perfil de expresión de las isoformas de NR1 que contienen exon 5 en el desarrollo embrionario de la retina.

El análisis de la expresión del exón alternativo 5 durante el DE de la retina sugiere que existe un recambio de las subunidades NR1 en los NMDARs durante el proceso: Mientras que en E8 predomina, como en el cerebro, la isoforma sin el exón 5, su expresión disminuye gradualmente hacia la eclosión, en paralelo con un incremento de la expresión de N1 con exón 5, condición que se mantiene en la retina madura (Figura 9B).

3. Expresión de las variantes de NR1 en el extremo C-terminal en la retina y en el cerebro.

Análisis de las variantes por empalme alternativo del casete C1.

El exón 21 codifica para el casete C-terminal C1. Se propone que este casete interviene en la expresión de los NMDARs en la membrana (Okabe, et al., 1999), así como en su agrupamiento y asociación con neurofilamentos (Ehlers, et al., 1998). Para la identificación de variantes de NR1 con exón 21 (casete C1) en la retina de pollo se utilizaron “primers” complementarios a los exones 19 y 22. Los datos obtenidos demuestran que existe una mayor expresión de isoformas que contienen exón 21 en el cerebro en comparación con la retina (Figura 10A). El casete C1 de pollo que describimos posee alta homología con la secuencia correspondiente de pato (96%) y de rata (82%; Figura 11B); incluye, asimismo, los sitios de fosforilación por PKC y la señal de retención en el retículo endoplásmico, descrita anteriormente en el SNC (Figura 11B; Tingley, et al., 1993; Standley, et al., 2000).

Análisis de las variantes por empalme alternativo de los casetes C2 y C3.

Para determinar la expresión relativa de las variantes de NR1 que incluyen los casetes alternativos C1 y C2, se diseñaron “primers” para amplificar la región comprendida entre los exones 20 y el final de la primera región codificadora (par de “primers” 2868F y 3390R, Tabla I). La RT-PCR del mRNA de cerebro de pollo amplificó exclusivamente un fragmento de 550 pb, que corresponde a isoformas de NR1 que incluyen tanto el exón 21 (casete C1), como el exón 22 (casete C2). En

contraste, en la retina se amplificaron 3 fragmentos: uno de 550 pb, que corresponde al identificado en el cerebro (que contiene C1 y C2); uno de 440 pb que corresponde, por análisis de secuencia del DNA, a variantes que carecen de exón 21 (casete C1) y contienen el casete C2 y un tercer fragmento de 480 pb. Es importante destacar que este fragmento (480 pb) carece de exón 21 y contiene una inserción de 41 pb en el DNA que no tiene homología ni con el exón 21, ni con ninguna otra secuencia descrita en el sistema nervioso (Figura 11A). Este exón codifica a seis aminoácidos en fase con la secuencia del exón precedente (exón 20), seguido de un codón de terminación (ver Fig. 11C). Por tanto, identificamos en la retina isoformas de NR1 que contienen un nuevo exón, presente en el gene de NR1 del pollo (Zarain-Herzberg y col., en revisión) y que codifica para un nuevo casete alternativo al que denominamos C3 (Figura 17 en la Discusión).

Los transcritos para NR1 en la rata se procesan por empalme alternativo en el exón 22, que tiene dos sitios aceptores de empalme. La utilización del primer sitio de empalme da lugar a las isoformas que contienen casete C2, en tanto que la utilización del segundo sitio genera las isoformas que contienen casete C2'. Como resultado de la reciente clonación del gene para NR1 de pollo, se sugirió que las aves no tienen dos sitios aceptores de empalme en el exon 22, lo que implica que no expresan casete C2' (Zarain-Herzberg, y cols. en revisión). Se diseñaron primers para amplificar un segundo marco de lectura abierto (ORF) hacia el extremo 3' del primer codón de término, sin embargo no fue posible identificar mRNAs que utilicen de manera alternativa el segundo ORF.

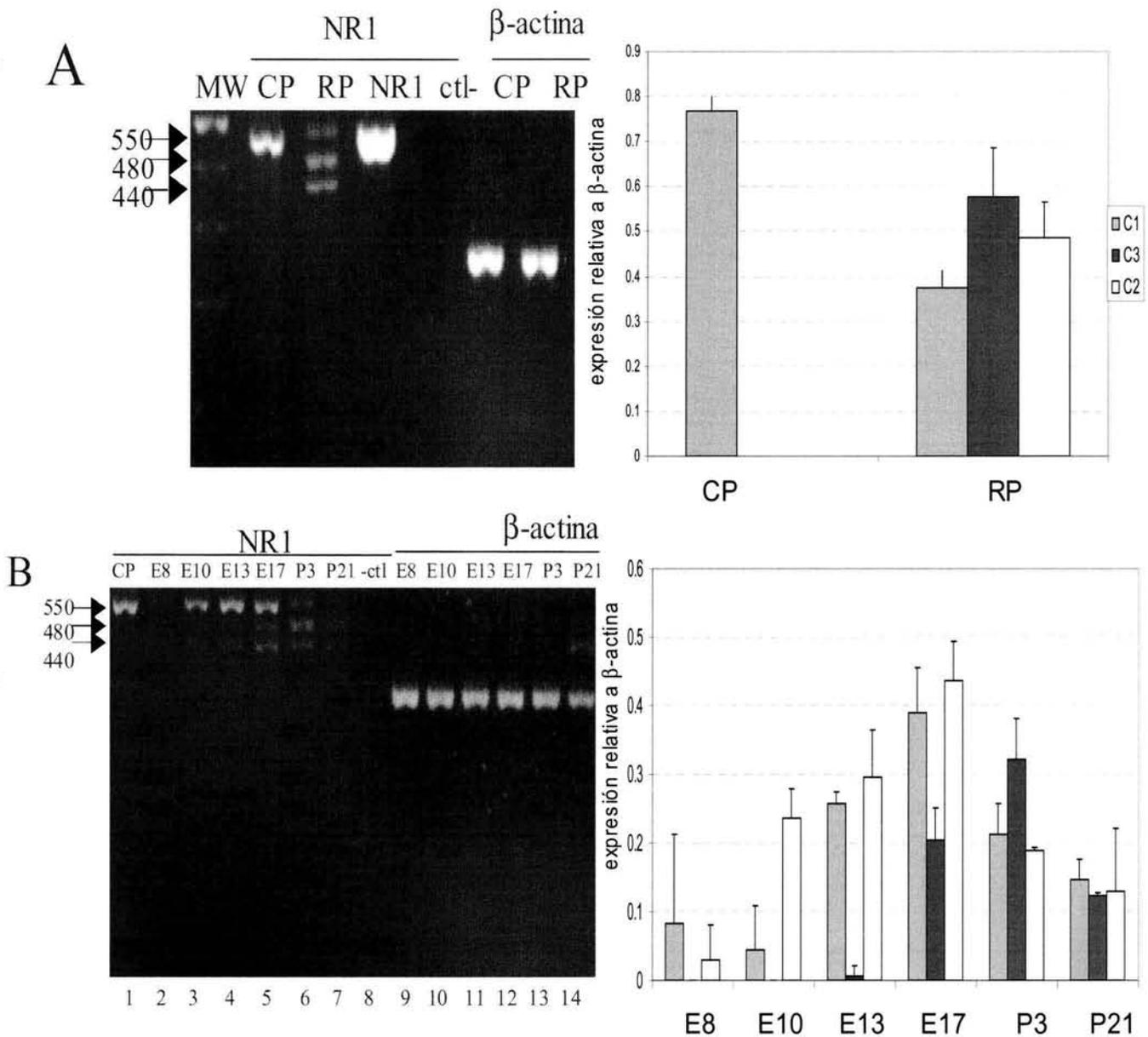


Figura 10. Expresión de las variantes de NR1 en el extremo 3' que contiene casete C2. El perfil de expresión de NR1 se determinó por RT-PCR usando un juego de primers que amplifica desde el exon 20 hasta el primer codón de término en el exon 22. **(A)** Comparación entre la retina madura y el cerebro. **(B)** Perfil de expresión durante el DE. Se amplificó mRNA de actina como control de expresión y se normalizaron los resultados como se menciona en los métodos. Las gráficas a la derecha corresponden al análisis densitométrico normalizado de los geles mostrados. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes. **A:** CP, cerebro de pollo; RP, retina de pollo; NR1, control positivo, plásmido que contiene NR1 de pato; -ctl, control negativo, amplificación de retina de pollo sin reverse transcriptasa. **B:** retinas de 8, 10, 13, y 17 días de DE; P3, retina de pollo de 3 días de nacidos; P21 retina de pollo de 21 días de nacidos

B

```

1 - GATTCCCGTAGCAATGCCCCAGCAACACTCACCTTTGAAAATATGGCAGGTGTGTTTATG - 60
  - D S R S N A P A T L T F E N M A G V F M
61 - CTGGTGGCTGGAGGTATTGTTGCCGGGATATTTTAAATATTCATAGAAATAGCTTACAAA - 120
  - L V A G G I V A G I F L I F I E I A Y K
121 - AGGCATAAGGACGCGCGGAGGAAGCAGATGCAGCTGGCGTTTGGCGCCGTTAATGTGTGG - 180
  - R H K D A R R K Q M Q L A F A A V N V W
181 - AGGAAAAACCTGCAGGATAGAAAAAGTGGTAGAGCAGAACCTGACCCTAAAAAGAAAGCC - 240
  - R K N L Q D R K S G R A E P D P K K K A
241 - ACTTTTAGGTCCATCACCTCCACCCTGGCCTCCAGCTTCAAGAGACGTAGGTCCTCCAAG - 300
  - T F R S I T S T L A           F K R R R           K
301 - GATACGCCCTGCAGAATGGTCCCTCAGGAGTGCCAGAGAGACAGGCTGGCACCATGGAGC - 360
  - D T P C R M V P Q E C Q R D R L A P W S
361 - CAAGACAGCCCCGGGAAGCTGCCACCCCACTGTAACGTCCTAGCGCCACCATCACCCG - 420
  - Q D S P G K L P P H S E R P S A H H H P
421 - AGCTGCACAGCCTCTCCGCGGCACATCATCCCCACCGCCCCAGGAGGAGATGCATGTGTT - 480
  - S C T A S P R H I I P T A P G G D A C V
481 - CCCCATAGGCAGCTCCTGCAACTCGAATAGCACTCGCAGAG - 521
  - P H R Q L L Q L E *

```

C

```

1 - TGCGGGGTTTTTATATTCATAGAAATAGCTTACAAAAGGCATAAGGACGCGCGGAGGAAG - 60
  - C G V F I F I E I A Y K R H K D A R R K
61 - CAGATGCAGCTGGCGTTTGGCGCCGTTAATGTGTGGAGGAAAAACCTGCAGGAGGAAACG - 120
  - Q M Q L A F A A V N V W R K N L Q E E T
121 - TCAGAGCACTAGTATCTGGTACATTGCTAGAAGCCCTGCAGAATGGTCCCTCAGGAGTGC - 180
  - S E H *
181 - CAGAGAGACAGGCTGGCTCCATGGAGCCAAGACAGCCCCGGGAAGCTGCCACCCACTCTG - 240
  -
241 - AACGTCTTAGCCCACCATCACCCGAGCTGCACAGCCTCTCCGCGGCACATCATCCCCACC - 300
  -
301 - GCCCCAGGAGGAGATCATGTGTTCCCCATAGCACTCCTGCAACTCGAATAGCACTCGCAG - 360
  -
361 - AGCTGACGTACTGCTTCCATTCA - 383

```

Figura 11. Análisis de la secuencia de las variantes en extremo 3' de NR1. **A:** Alineación de la secuencia de los productos de RT-PCR mostrados en la figura 10, con las secuencias reportadas de pato (D83352) y rata (L08228). Las regiones de alta homología se muestran en negro. La región correspondiente al exón 21 se muestra en gris, y está señalada por flechas que indican su inicio y término; dentro de esta región en letras negras se muestra la secuencia correspondiente al casete C3. **B:** Traducción del fragmento de RT-PCR de 550 pb de retina. La región que corresponde al exón 21 se muestra en gris. Los sitios de fosforilación por PKC (Tingley, et. al. 1997) se muestran en letras blancas, al igual que la señal de retención en el retículo endoplásmico (negritas). El sitio de N-miristoilación presente en C2 se encuentra subrayado y los posibles sitios de fosforilación y el codón de término se muestran en negritas. **C:** Traducción del fragmento de RT-PCR de 480pb de retina. El casete C3 aquí descrito se muestra en gris, y el codón de término se muestra en negritas.

Análisis comparativo de la expresión de las variantes por empalme del extremo C-terminal en el desarrollo embrionario de la retina.

Casete C1. Se encontró que la expresión de variantes con exón 21 se incrementa en forma paralela a la expresión general de NR1 durante el DE y alcanza su nivel máximo en el día E17 (Fig. 10B). Sin embargo, mientras que el nivel de expresión total de NR1 se mantiene en el tejido diferenciado, la expresión de las variantes con C1 declina entre E17 y la eclosión, lo que sugiere un aumento en la expresión de NR1 sin exón 21 hacia las fases finales del DE.

Casetes C2 y C3. La expresión de las variantes por empalme que contienen los casetes C1 y C2 durante el DE temprano (E8) es similar en la retina y el cerebro; la isoforma predominante es aquella que contiene el exón 21 (casete C1). La variante que carece del exón 21 se expresa más tardíamente, en E10. Ambas isoformas alcanzan el máximo de expresión en el E17 y su expresión se reduce después de la eclosión. La nueva variante, que contiene el casete C3 en cambio, comienza a expresarse al E13, alcanza un máximo al P3. La expresión de las 3 isoformas disminuye en la retina madura (P21; Fig. 10B).

4. Expresión de la proteína NR1.

La expresión de la proteína de NR1 se demostró por Western Blot usando anticuerpos específicos dirigidos al casete N1 de la región amino-terminal o al casete C1 de la región carboxilo-terminal de la proteína (Figura 12). Se analizó la NR1 de la fracción membranal de los sinaptosomas de las capas plexiformes externa (OPL) e interna (IPL) de la retina de embriones de pollo en E13 y E17, así como de pollos de 3 días de edad (P3). Estas etapas se seleccionaron por corresponder al inicio de la formación de contactos sinápticos y al estado diferenciado del tejido, respectivamente (Mey y Thanos, 2000). Los datos en la figura 12 demuestran que la expresión de la proteína NR1 predomina en la capa plexiforme interna de la retina, en concordancia con estudios previos en la retina de la rata (Gründer, et al., 2000), y

aumenta paralelamente a la maduración del tejido, lo que confirma los resultados obtenidos mediante la amplificación del RNAm de NR1 por RT-PCR (Fig. 8).

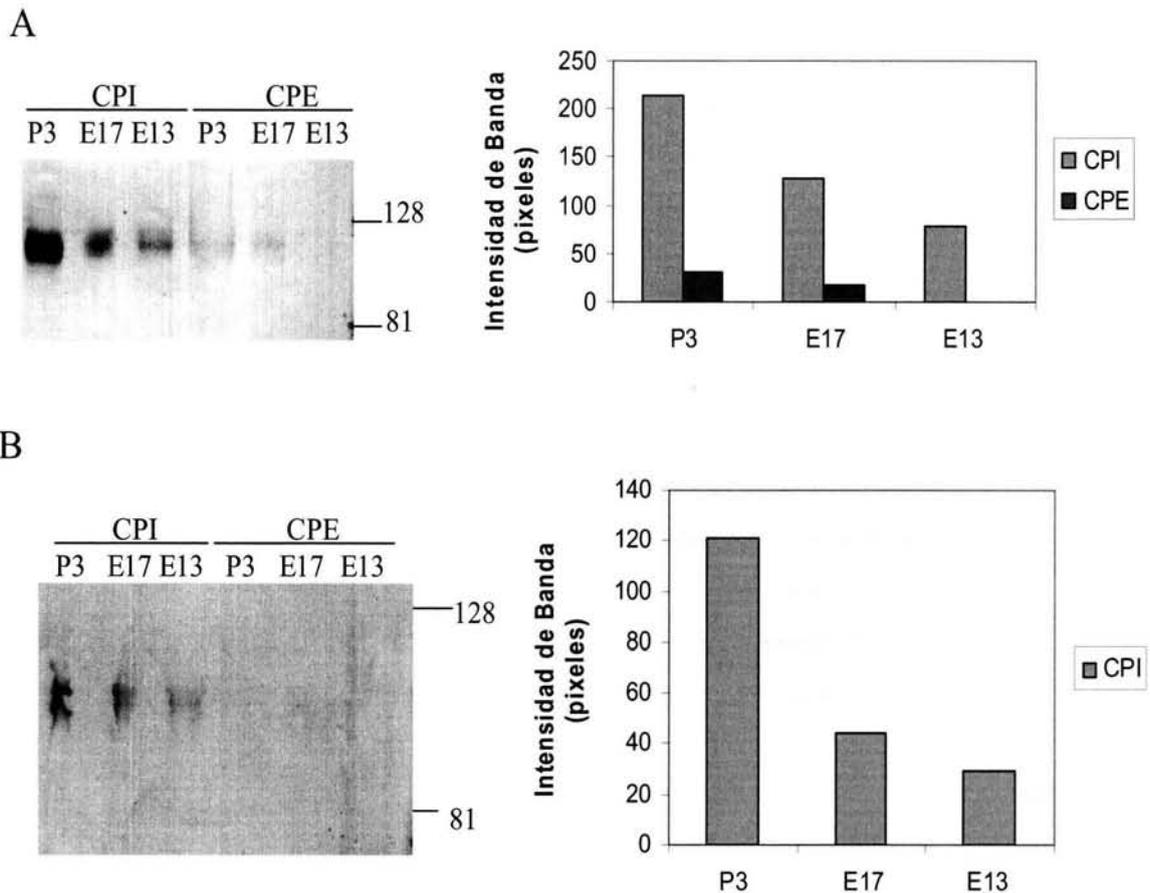


Figura 12. Análisis de la expresión de proteína de las isoformas de NR1 en la retina de pollo. Se muestra un experimento representativo. Se analizó la expresión de proteína en membranas de sinaptosomas por medio de Western Blots utilizando anticuerpos contra los casetes NI (**A**) y C1 (**B**). Las gráficas a la derecha corresponden al análisis densitométrico de los gels mostrados a la izquierda. **A:** Expresión de las isoformas de NR1 que contienen casete NI. Carriles 1-3 corresponden a la expresión en la capa plexiforme interna (CPI). Los carriles 4-6 corresponden a la expresión en la capa plexiforme externa (CPE). La expresión se monitoreó en E13, E17 y P3. **B:** Expresión de las isoformas de NR1 que contienen casete C1. Los carriles se muestran como en A.

II. Expresión de NR2.

1. Expresión de NR2A.

La expresión de la subunidad NR2A en los heterómeros le confiere a los receptores de NMDA una afinidad muy alta por los agonistas, una mayor sensibilidad al bloqueo por Mg^{++} , alta conductancia, y la constante de desactivación más rápida cuando se compara con las constantes observadas para las otras subunidades NR2. La inclusión de NR2A en los NMDAR en el sistema nervioso es característica de receptores sinápticos, y de etapas avanzadas de diferenciación (Cull-Candy, *et al.*, 2001).

Para estudiar la expresión de los transcritos de NR2A en la retina de pollo se diseñaron "primers" (ver Tabla III) como se describe en los métodos. Se confirmó que éstos fueran específicos para NR2A amplificando por PCR plásmidos que contienen NR2A, NR2B, NR2C, y NR2D. Se variaron la temperatura y la concentración de Mg^{++} para determinar las condiciones óptimas de ensayo, en las que solo se observa amplificación de NR2A. En estos ensayos se determinó que 57 °C y 3.5 mM de $MgCl_2$, corresponden a las condiciones ideales de amplificación.

Análisis comparativo entre la retina diferenciada y el cerebro.

La Figura 13A muestra que la retina expresa 3 veces más NR2A que el cerebro o el cerebelo. La expresión de NR2A en la retina madura podría ser consecuencia del estado de maduración de los circuitos sinápticos en P3.

Análisis del perfil de expresión de NR2A en el desarrollo embrionario de la retina.

En la Figura 13B se observa que a pesar de que NR2A se expresa desde E8, no se observa un aumento en los niveles de expresión sino hasta E13, periodo en el que comienza el refinamiento de conexiones sinápticas. El aumento es muy dramático para E17, y se observa el máximo de expresión en P3, que posteriormente disminuye en P21. Estos datos coinciden con los datos obtenidos para la retina de rata, y que sugieren que esta subunidad se expresa primordialmente en la retina madura.

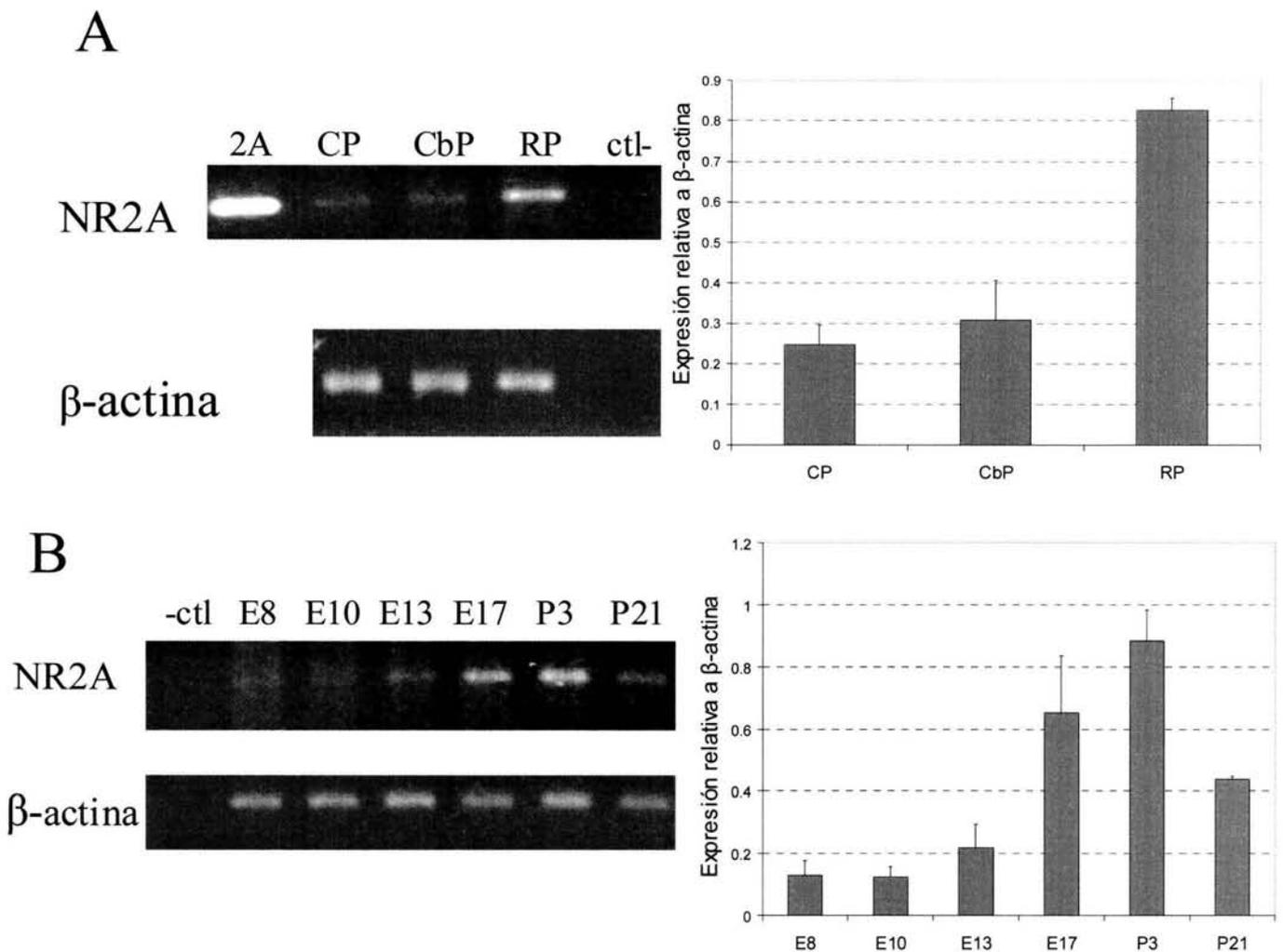


Figura 13. Expresión de NR2A en la retina de pollo. El perfil de expresión de NR2A se determinó por RT-PCR usando un juego de primers que amplifica la región que codifica para una parte del extremo C-terminal. **(A)** Comparación entre la retina madura y el cerebro. **(B)** Perfil de expresión durante el DE. Se amplificó mRNA de β -actina como control de expresión y se normalizaron los resultados como se menciona en los métodos. Las gráficas a la derecha corresponden al análisis densitométrico normalizado de los gels mostrados. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes. **A:** CP, cerebro de pollo; CbP, cerebelo de pollo; RP, retina de pollo; NR2A, control positivo, plásmido que contiene NR2A de rata; -ctl, control negativo, amplificación de retina de pollo sin reverse transcriptasa. **B:** retinas de 8, 10, 13, y 17 días de DE; P3, retina de pollo de 3 días de nacidos; P21 retina de pollo de 21 días de nacidos

2. Expresión de NR2B.

La inclusión de la subunidad NR2B en los receptores de NMDA le confiere a los mismos mayor afinidad por los agonistas glutamato y glicina que los receptores que contienen la subunidad NR2A. Ambos tipos de receptores forman canales de alta conductancia, sin embargo la constante de desactivación de los receptores que contiene NR2B son mayores que las de aquellos que contienen NR2A. Los receptores que contienen NR2B presentan gran sensibilidad a drogas como el ifenprodil y el haloperidol que actúan a través del sensor de protones del receptor (Cull-Candy, et al., 2001). La subunidad NR2B se expresa predominantemente en la etapa embrionaria en el SNC de la rata, y recientemente se ha sugerido que los receptores que contienen esta subunidad en etapas maduras son receptores de tipo extrasináptico (Stocca y Vicini, 1998, Rumbaugh y Vicini, 1999)

Para el estudio de las subunidades NR2B en la retina se usaron primers que han sido descritos previamente (Itzstein y Espinosa, 2001). Sin embargo también se confirmó su especificidad en reacciones de PCR utilizando plásmidos que contienen NR2A, NR2B, NR2C y NR2D. Las condiciones óptimas de amplificación para NR2B son 1.66 mM de MgCl₂, y 56 °C.

Análisis comparativo entre la retina diferenciada y el cerebro.

El análisis de la expresión de NR2B reveló que en el cerebro esta subunidad se expresa dos veces más que en retina o el cerebelo (Figura14).

Análisis del perfil de expresión de NR2B en el desarrollo embrionario de la retina.

En la Figura 14 se muestra que la subunidad NR2B se expresa desde el día E8, aumenta su expresión del día E10 en adelante. La expresión temprana de esta subunidad apoya la idea de que los tejidos cuyas conexiones sinápticas no se han consolidado expresan receptores que contienen NR2B en mayor proporción que NR2A.

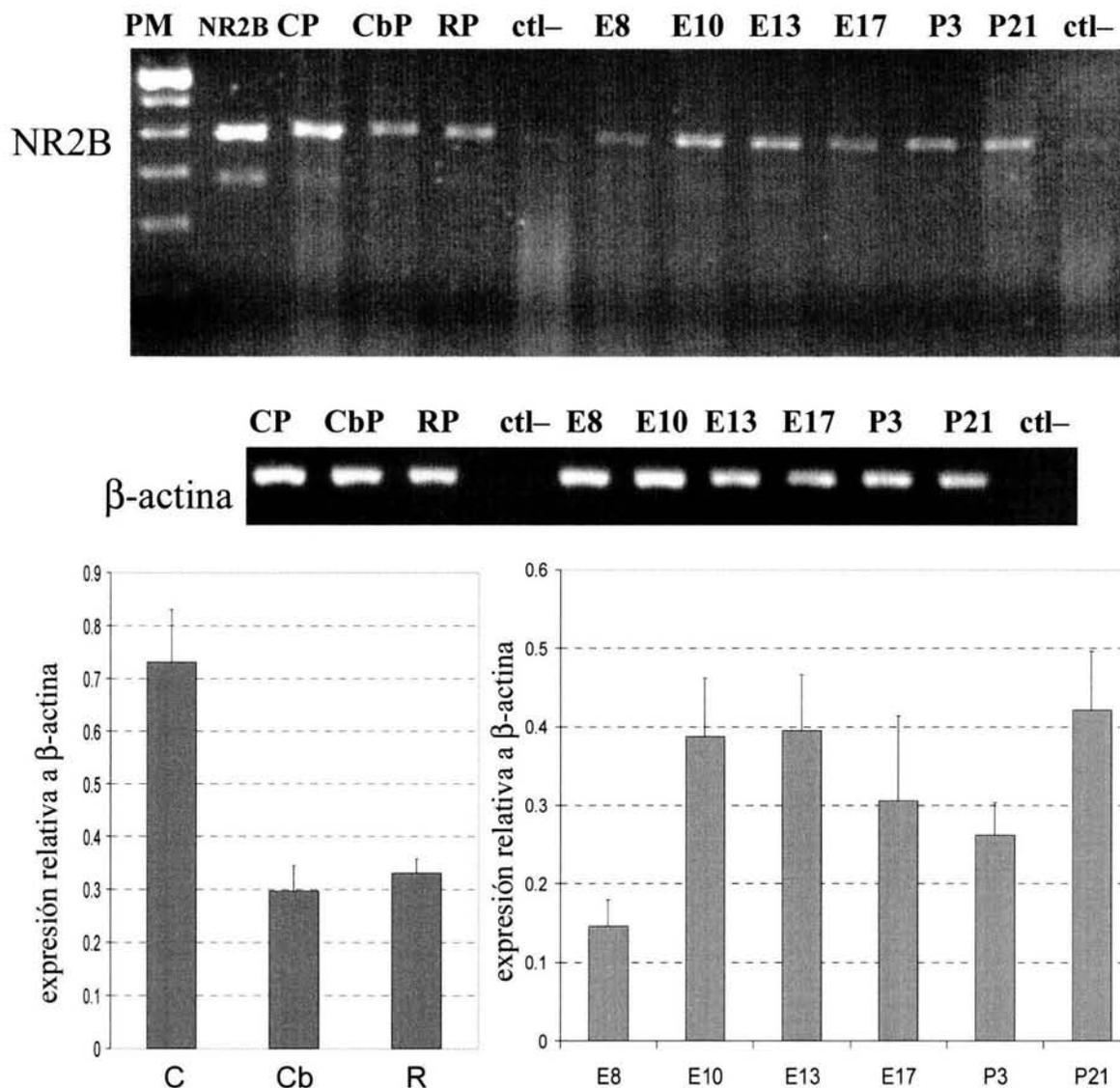


Figura 14. Expresión de NR2B en la retina de pollo. El perfil de expresión de NR2B se determinó por RT-PCR usando un juego de primers que amplifica la región que codifica para una parte del extremo C-terminal. En los carriles 3-6 del panel superior se muestran los perfiles de expresión en el cerebro, el cerebelo y la retina madura de pollo. En los carriles 7-12 se muestra el perfil de expresión durante el DE. Se amplificó mRNA de β -actina como control de expresión y se normalizaron los resultados como se menciona en los métodos. Las gráficas abajo corresponden al análisis densitométrico normalizado de los geles mostrados. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes. PM: escalera de DNA de 100pb (se muestran de arriba abajo marcadores de 600-200pb. CP, cerebro de pollo; CbP, cerebelo de pollo; RP, retina de pollo; NR2B, control positivo, plásmido que contiene NR2B de rata; -ctl, control negativo, amplificación de retina de pollo sin transcriptasa reversa. E8,E10,E13,E17: retinas de 8, 10,13, y 17 días de DE; P3, retina de pollo de 3 días de nacidos; P21 retina de pollo de 21 días de nacidos

3. Expresión de NR2C.

Los NMDAR que contienen NR2C presentan características tanto fisiológicas como farmacológicas muy particulares. Estos receptores poseen conductancia baja y constantes de desactivación lentas, sin embargo su característica más notoria es su baja sensibilidad al bloqueo por Mg^{++} que, aunque no se ha estudiado en detalle, le permitiría a los receptores que contienen esta subunidad operar en potenciales de membrana más negativos que los receptores que contienen NR2A o NR2B. Es importante hacer notar que esta subunidad solo se ha identificado en las neuronas granulares de cerebelo y en la retina. Esta subunidad se expresa primordialmente en etapas avanzadas del desarrollo siendo característica de neuronas maduras (Cathala, *et al.*, 2000).

El diseño de los primers para el estudio de NR2C se llevó a cabo como se describe en los métodos y su secuencia se muestra en la tabla III. Se confirmó su especificidad como se describió anteriormente para NR2A, a 62 °C y 1.66 mM de $MgCl_2$ sólo se observó una banda de aproximadamente 120 pb cuando se amplificó NR2C a partir de RNA total.

Análisis comparativo entre la retina diferenciada y el cerebro.

La Figura 15 muestra que la retina y el cerebelo expresan aproximadamente 2.5 veces más NR2C que el cerebro, cuyos niveles de expresión son apenas detectables. Estos datos concuerdan con lo que se ha descrito anteriormente en la literatura (Monyer, *et al.*, 1994, Brandstätter, *et al.*, 1994).

Análisis del perfil de expresión de NR2C en el desarrollo embrionario de la retina.

Durante el desarrollo de la retina se observa que NR2C se expresa desde etapas tempranas del desarrollo de la retina, y su expresión permanece más o menos constante a todo lo largo del DE (Figura 15). La expresión de NR2C a tiempos tempranos en el DE de la retina contrasta con lo que se ha descrito para la rata (Gründer, *et al.*, 2000, Cathala, *et al.*, 2000).

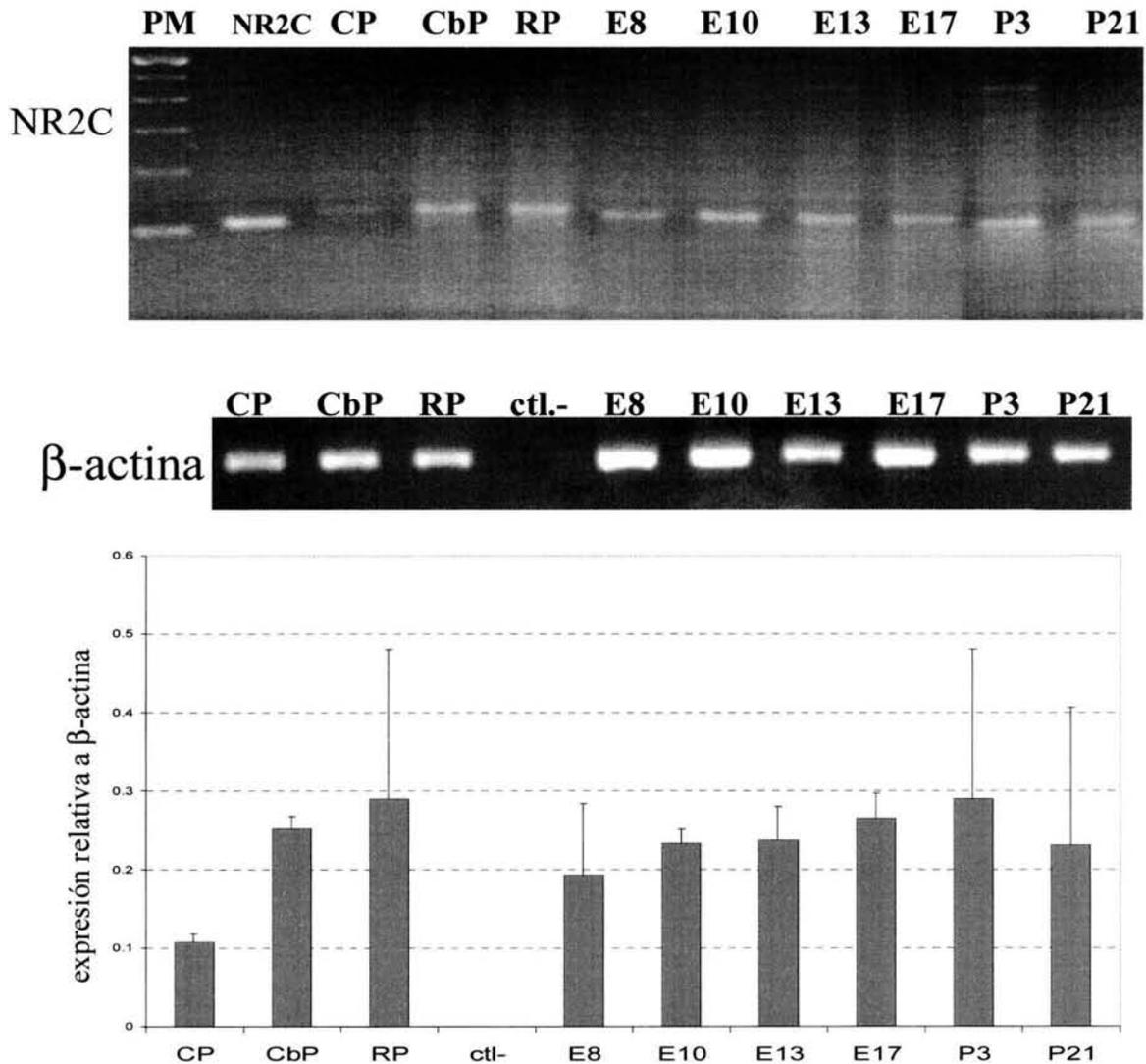


Figura 15. Expresión de NR2C en la retina de pollo. El perfil de expresión de NR2C se determinó por RT-PCR usando un juego de primers que amplifica la región que codifica para una parte del extremo C-terminal. En los carriles 3-6 del panel superior se muestran los perfiles de expresión en el cerebro, el cerebelo y la retina madura de pollo. En los carriles 7-12 se muestra el perfil de expresión durante el DE. Se amplificó mRNA de β -actina como control de expresión y se normalizaron los resultados como se menciona en los métodos. Las gráficas abajo corresponden al análisis densitométrico normalizado de los geles mostrados. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes. PM: escalera de DNA de 100pb (se muestran de arriba abajo marcadores de 600-100pb). CP, cerebro de pollo; CbP, cerebelo de pollo; RP, retina de pollo; NR2C, control positivo, plásmido que contiene NR2C de rata; -ctl, control negativo, amplificación de retina de pollo sin transcriptasa reversa. E8, E10, E13, E17: retinas de 8, 10, 13, y 17 días de DE; P3, retina de pollo de 3 días de nacidos; P21 retina de pollo de 21 días de nacidos

4. Expresión de NR2D.

Los NMDARs que contienen la subunidad NR2D poseen constantes de desactivación hasta 50 veces más lentas que aquellos que contienen NR2A. Estos receptores presentan baja conductancia y poca sensibilidad al Mg^{++} , al igual que aquellos que contienen NR2C. Sin embargo a diferencia de NR2C, NR2D se expresa durante etapas tempranas del desarrollo, es preferentemente extrasináptica, y sólo se ha observado en la sinápsis en receptores con propiedades triheteroméricas (Dunah, *et al.*, 1998).

Para el estudio de las subunidades NR2D en la retina se usaron primers que han sido descritos previamente (Itzstein y Espinosa, 2001). La especificidad de los primers se confirmó como se ha descrito para NR2A, NR2B y NR2C. Las condiciones óptimas de amplificación son 57°C y 1.5 mM de $MgCl_2$.

Análisis comparativo entre la retina diferenciada y el cerebro.

Como se observa en la Figura 16, la retina madura no expresa NR2D. Los niveles de expresión tanto en cerebro como en cerebelo son escasamente detectables. Estos resultados coinciden con lo esperado como se discutirá más adelante.

Análisis del perfil de expresión de NR2D en el desarrollo embrionario de la retina.

La Figura 16 muestra el perfil en el desarrollo de NR2D. Se observa que esta subunidad se expresa primordialmente en etapas embrionarias y desaparece después de la eclosión. Sus niveles de expresión son mayores en etapas tempranas del desarrollo y va disminuyendo paulatinamente hasta desaparecer en P3. Estos resultados coinciden con aquellos descritos para NR2D en la retina de ratón (Watanabe, *et al.*, 1994), pero difieren de los de la rata (Gründer, *et al.*, 2000, Brandstätter, *et al.*, 1994).

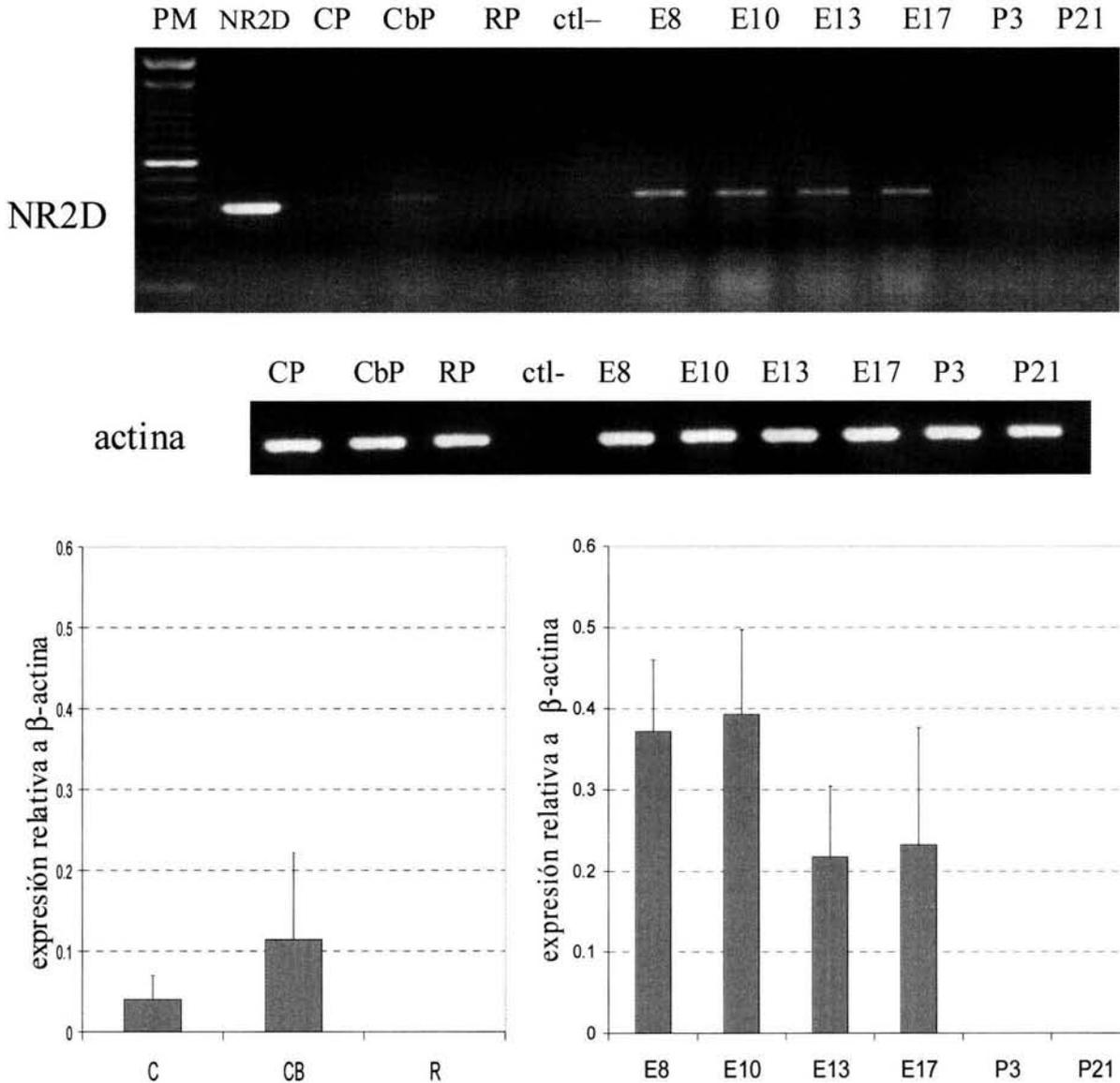


Figura 16. Expresión de NR2D en la retina de pollo. El perfil de expresión de NR2D se determinó por RT-PCR usando un juego de primers que amplifica la región que codifica para una parte del extremo C-terminal. En los carriles 3-6 del panel superior se muestran los perfiles de expresión en el cerebro, el cerebelo y la retina madura de pollo. En los carriles 7-12 se muestra el perfil de expresión durante el DE. Se amplificó mRNA de β -actina como control de expresión y se normalizaron los resultados como se menciona en los métodos. Las gráficas abajo corresponden al análisis densitométrico normalizado de los geles mostrados. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes. PM: escalera de DNA de 100 pb. CP, cerebro de pollo; CbP, cerebelo de pollo; RP, retina de pollo; NR2D, control positivo, plásmido que contiene NR2D de rata; -ctl, control negativo, amplificación de retina de pollo sin transcriptasa reversa. E8,E10,E13,E17: retinas de 8, 10,13, y 17 días de DE; P3, retina de pollo de 3 días de nacidos; P21 retina de pollo de 21 días de nacidos

DISCUSIÓN.

Este trabajo analiza la expresión de las subunidades NR1 y NR2 de los receptores de tipo NMDA en la retina de pollo. Se examinó la expresión de las variantes de la subunidad NR1 generadas por empalme alternativo, así como de las subunidades NR2 (A-D). Este es el primer estudio comparativo de la expresión de las subunidades del NMDAR en la retina y el cerebro. Demostramos la presencia en la retina de variantes de NR1 distintas de las descritas previamente en el SNC, que se expresan diferencialmente durante el desarrollo embrionario y postnatal del tejido. Se identificó una nueva variante de NR1, no descrita previamente en el sistema nervioso (designada C3), y se demostró que su expresión se restringe al período del desarrollo en el que se establecen las conexiones sinápticas. Esta variante podría ser específica del cerebelo y la retina dada la similitud en el perfil de expresión de las subunidades del NMDAR en ambos tejidos. Se demostró asimismo la expresión diferencial de las subunidades NR2 en la retina, el cerebro y el cerebelo, así como su perfil de expresión en el proceso de maduración de la retina durante el DE. Las diferencias que aquí observamos en el control de la expresión de las subunidades de los NMDARs en la retina podrían ser responsables de las características bioquímicas y electrofisiológicas de los NMDARs en la retina.

I. Expresión de las subunidades del NMDAR en la retina diferenciada.

A. Expresión de NR1 en la retina diferenciada.

1. Variantes de NR1 en la región N-terminal.

Los resultados de este estudio sugieren que las características distintivas de los NMDARs en la retina adulta, relacionadas con el efecto de la espermina y la potencia y eficiencia de los antagonistas, podría deberse a la expresión predominante de

isoformas de NR1 que contienen exón 5, en contraste con el SNC, en el que predominan las variantes sin este exón.

La inclusión de NR1 con el exón 5 disminuye la afinidad de los NMDARs por los agonistas, así como por los antagonistas competitivos como el APV y el CPP, por el bloqueador de canal abierto MK-801, así como por el 7-CK, antagonista competitivo de la glicina en el sitio del coagonista (Durand, et al., 1993, Hollmann, et al., 1993). La expresión mayoritaria de NR1 con exón 5 en la retina adulta, (Figura 9) contribuye a explicar las diferencias en la unión específica de los antagonistas CPP y el MK-801(+) (López-Colomé y Somohano, 1992, Boje, et al., 1992). Respecto a la glicina, su interacción con el sitio del coagonista en las membranas de la retina no se modifica significativamente por los antagonistas específicos 7CK y 5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalina-2,3-diona (ACEA-1021) (Rodríguez-Contreras, et al., 1998), lo que explica la ineficiencia del 7CK en la protección de las neuronas de la retina en la isquemia, a diferencia de su efecto positivo en el cerebro (Lombardi y Moroni, 1994). Asimismo, la inclusión de NR1 con el exón 5 en los NMDARs de la retina madura (Fig. 9) contribuye a explicar el efecto opuesto de las poliaminas (PAs) en la retina y el cerebro. En este último, las PAs estimulan la respuesta al NMDA a través de un incremento en la afinidad de la glicina por el sitio del coagonista (Benveniste y Mayer, 1993), mientras que en la retina, la espermina inhibe la unión de glicina al mismo (Calderón y López-Colomé, 1998).

La expresión de isoformas que contienen el casete N1 conlleva diferencias en las propiedades farmacológicas del sitio de unión a la glicina dado que este sitio reside en NR1. Sin embargo, tanto los sitios de interacción del CPP y el MK-801 (Lombardi y Moroni, 1994, Buller, *et al.*, 1994, Kashiwagi, *et al.*, 2002) como el efecto de las PAs (Williams, *et al.*, 1995), involucran una interacción compleja entre NR1 y NR2, por lo que las características particulares de los NMDARs de la retina podrían derivar tanto de la NR1 con el casete N1 que demostramos, como de la inclusión de la subunidad NR2C, cuya expresión es casi exclusiva de la retina y el cerebelo (Monyer, et al., 1994, Brandstätter, et al., 1998, Cristovao, *et al.*, 2002; Figura 15).

2. Variantes por empalme del extremo C-terminal de NR1.

Demostramos que en la retina de pollo diferenciada predomina la expresión de variantes de NR1 que contienen el nuevo exón C3 y adicionalmente, se expresan variantes que contienen el exón 21 o variantes cortas que expresan únicamente casete C2 (Fig. 3A y Fig 17).

Análisis del casete C1.

La región C-terminal de NR1 varía ampliamente entre las especies (Bottai, *et al.*, 1998). La comparación de la secuencia genómica de NR1 de rata, con el cDNA de NR1 de pato y con el segmento C-terminal expresado en la retina de pollo (Fig. 11A) demuestra que existe alta homología entre ellos hasta el final del exón 21. El casete C1 de pollo aquí descrito es 100% homólogo al de rata, cuya secuencia contiene sitios de interacción con neurofilamentos (Ehlers, *et al.*, 1998), y juega un papel importante en la expresión y agrupamiento de las subunidades en la membrana plasmática (Okabe, *et al.*, 1999). El análisis de la secuencia del casete C1 de pollo también reveló la existencia de sitios consenso para la fosforilación por PKC y PKA, que han sido descritos en la rata (Tingley, *et al.*, 1997, Tingley, *et al.*, 1993), así como una señal de retención en el retículo endoplásmico y un sitio de unión para calmodulina, que controla la inactivación de los NMDARs (Ehlers, *et al.*, 1996); Fig. 11B).

Análisis de los casetes C2/C2'.

El análisis de la región C-terminal demostró la existencia de diferencias importantes entre la NR1 de mamíferos y la de las aves. El exón 22 del gene de NR1 de rata tiene dos sitios aceptores de empalme, cuyo uso alternativo se traduce en la expresión de los casetes C2 o C2', lo que determina diferencias en los mecanismos de transporte a la membrana entre las distintas isoformas. Con objeto de investigar si las aves tienen, como los mamíferos, un sitio alternativo de terminación en el exón 22, se analizó la secuencia del extremo 3' del gene de pollo (Zarain-Herzberg, *et al.*, en revisión) para identificar un segundo marco de lectura abierto después del primer codón de término. El análisis del perfil de expresión del mRNA en cerebro cerebelo y retina en distintas etapas del DE demuestra que no se utiliza un segundo sitio de

empalme alternativo, lo que sugiere que en las aves no se expresan subunidades con el casete C2'. Asimismo, a diferencia de los mamíferos, el casete C2 de las aves no tiene sitios de unión con dominios PDZ ni secuencias específicas de unión con la proteína PSD95 que, en la NR1 de rata, permiten el anclaje y localización de los receptores en la membrana (Kornau, *et al.*, 1995, Standley, *et al.*, 2000). Sin embargo, identificamos en el casete C2 de pollo sitios consenso de fosforilación por PKC y uno de N-miristoilación que no han sido descritos (Fig. 11B) y podrían mediar la expresión membranal de los receptores, dada la ausencia de sitios de interacción con dominios PDZ. En esta línea, estudios en el pez teleosteo *Apteronotus leptorhynchus* han demostrado que existen diferencias significativas entre el extremo C-terminal de la NR1 de este pez y la de mamíferos (Bottai, *et al.*, 1998). El casete C2 de este pez no tiene homología ni con la secuencia descrita para mamíferos ni con el casete C2 de pollo. Estos resultados sugieren que los mecanismos que regulan la expresión y localización sináptica de los NMDARs difieren entre las especies.

Análisis del casete C3.

La variante por empalme de NR1 que contiene el casete C-terminal C3 descrita por primera vez en este estudio, se ha observado exclusivamente en la retina y el cerebelo de pollo; incluye seis aminoácidos (EETSEH) a continuación del casete C0 (porción C-terminal que sigue al último segmento transmembranal y precede al casete C1), es codificada por un exón de 42 pb que no existe en el gene de la rata (Figura 11C, Figura 17), y no tiene homología significativa con ninguna secuencia en la base de datos de nucleótidos (Genebank). El nuevo casete C3, exón 20 en el gene de NR1 del pollo (Zarain-Herzberg y col., *en revisión*), no tiene equivalente en el gene de NR1 de los mamíferos, incluida la secuencia genómica de la rata, del ratón, así como el gene de NR1 humano. Cabe mencionar, sin embargo, que la subunidad NR1 de *Apteronotus leptorhynchus* posee varios exones en el extremo 3' que se traducen en casetes que se expresan alternativamente (Bottai, *et al.*, 1998). Aunque C3 no tiene homología con los casetes de *Apteronotus*, es importante notar la variación de la región 3' del gene para NR1 que existe entre especies.

El análisis de la secuencia del exón que codifica para el casete C3 reveló que éste incluye una secuencia de fosforilación por la caseína cinasa II (CKII) (Meggio, *et al.*, 1994, Kuenzel, *et al.*, 1987); Fig. 11C). El significado fisiológico de este sitio se desconoce, sin embargo, recientemente se demostró la intervención de la CKII en el mantenimiento de la actividad basal del canal de los NMDARs en el hipocampo (Lieberman y Mody, 1999), así como en la regulación de los ritmos circadianos, proceso en el cual, claramente, está involucrada la retina de las aves (Whitmore, *et al.*, 2000).

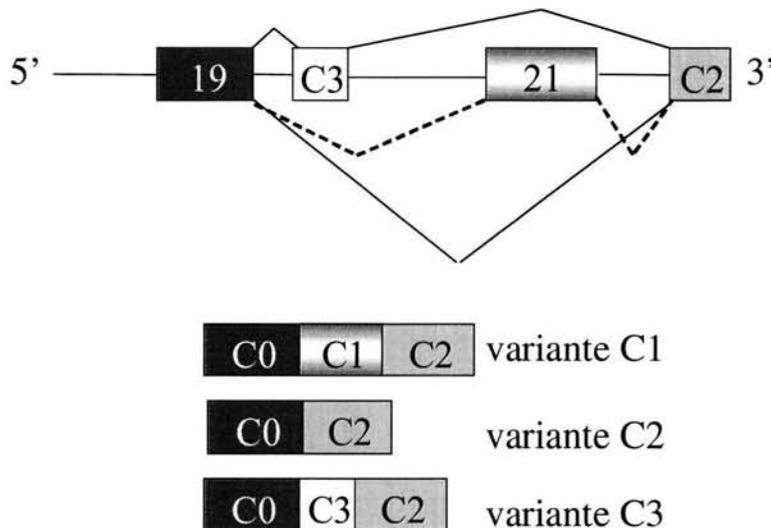


Figura 17. Varaintes de empalme alternativo en el extremo C-terminal de NR1 de pollo. Esquema de la región 3' del gene de NR1 de pollo que al procesarse por empalme alternativo da lugar a 3 varaintes en el extremo C-terminal: La varainte C1 que contiene el cassette C1 y C2, la variante C3 que contiene el casete C3 y C2, y la varainte C2, que contiene únicamente el casete C2.

B. Expresión de NR2 en la retina diferenciada.

Un mecanismo importante involucrado en la regulación de las propiedades fisiológicas de los receptores para NMDA es el control de la expresión de sus subunidades, en particular de la familia NR2. Estas subunidades contienen el sitio de unión al glutamato, y contribuyen de manera importante al control de la permeabilidad del canal y la sensibilidad al Mg^{++} (Kutsuwada, *et al.*, 1992). La

elucidación de las propiedades del heterómero requiere, por tanto, la identificación de las subunidades NR2 que se expresan en el tejido.

1. Expresión de NR2A.

Los NMDARs que contienen la subunidad NR2A son canales de alta conductancia y gran sensibilidad al bloqueo por Mg^{++} . Se caracterizan por tener la menor sensibilidad al glutamato y menor constante de desactivación que receptores con otro tipo de NR2 (ver Tabla I). Los receptores que contienen NR2A son principalmente de tipo sináptico, y su expresión se inicia en el periodo crítico de la consolidación de las sinápsis (Monyer, et al., 1994, Scheetz y Constantine-Paton, 1994).

Demostramos que la expresión del mRNA de la subunidad NR2A en la retina es tres veces mayor que en el cerebro y el cerebelo (Figura 13). La menor afinidad por glutamato de los NMDARs en la retina (López-Colomé, 1981) con respecto al cerebro (Angelatoy, et al., 1986) podría ser consecuencia de la inclusión de esta subunidad en los heterómeros. Es importante considerar que en la retina madura el glutamato se libera de manera tónica, por lo que la inclusión de NR2A en los receptores podría constituir un mecanismo protector contra la excitotoxicidad en este tejido. La expresión de NR2A en la retina de ratón (Watanabe, et al., 1994) y en la de rata se ha demostrado por técnicas de hibridación *in situ*, e inmunohistoquímica (Brandstätter, et al., 1994). En ambas especies la expresión de NR2A predomina en la capa nuclear interna (INL) y en la capa de células ganglionares (GCL) por lo que parece restringirse a células ganglionares y amacrinas. En la retina de pollo el único estudio enfocado a dilucidar la composición heteromérica de los NMDARs no es claro, debido a la falta de especificidad del anticuerpo utilizado que reconoce tanto NR2A como NR2B (Cristovao, et al., 2002).

2. Expresión de NR2B.

La inclusión de la subunidad NR2B en los heterómeros confiere al receptor una gran sensibilidad al glutamato aunada a una constante de desactivación de 300 ms (la más rápida determinada en sistemas heterólogos para las subunidades NR2). Estos

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

receptores son, al igual que los receptores que contienen NR2A, muy susceptibles al bloqueo por Mg^{++} . Puesto que la liberación del bloqueo por Mg^{++} depende de voltaje, estos receptores solo se activan en condiciones despolarizantes, lo que les permite actuar como detectores de actividad sináptica en el desarrollo embrionario, donde juegan un papel importante (Cull-Candy, et al., 2001). Adicionalmente, en la corteza visual y el cerebelo actúan como moduladores de la neurotransmisión, ya que en su mayoría los NMDARs que contienen NR2B son receptores extrasinápticos (Cull-Candy, et al., 1998, Stocca y Vicini, 1998). El análisis de la expresión de NR2B reveló que en la retina y en el cerebelo la expresión de NR2B es dos veces menor que en el cerebro (Figura 14). Puesto que los NMDARs que contienen esta subunidad son los más permeables al calcio, la menor expresión relativa de esta subunidad con respecto a NR2A en la retina madura podría relacionarse con el estricto control del influjo de Ca^{++} necesario para proteger a las células de la excitotoxicidad. A este respecto, es importante señalar que existen diferencias en las vías de señalamiento a partir de los receptores sinápticos y extrasinápticos: la estimulación de los primeros conduce a la activación de CREB (cAMP-response element-binding protein, por sus siglas en inglés), que está relacionada con el incremento de la supervivencia celular, en tanto que los receptores extrasinápticos regulan su inactivación (Hardingham y Bading, 2002).

Estudios previos, enfocados en la expresión de NR2B en la retina demostraron que en la rata adulta esta subunidad se expresa principalmente en la INL y en menor medida en la GCL (Brandstätter, et al., 1994), mientras que en la retina de ratón se expresa de manera homogénea en ambas capas (Watanabe, et al., 1994). Estudios posteriores demostraron inmunoreactividad para NR2B en las células ganglionares de retina de rata (cuyos cuerpos celulares se localizan en la GCL), y amacrinas (INL) así como, en las horizontales (localizadas en la ONL) (Gründer, et al., 2000). En la retina de pollo no ha sido posible dilucidar en qué tipos celulares se expresa esta subunidad, y es difícil especular debido a que las diferencias observadas en los roedores son atribuibles tanto a las técnicas usadas como a diferencias entre las especies.

3. Expresión de NR2C.

La presencia de la subunidad NR2C le confiere a los NMDARs que la contienen características tanto fisiológicas como farmacológicas muy particulares: tienen baja conductancia y poca sensibilidad al bloqueo por Mg^{++} , lo que implica que pueden activarse en condiciones de baja despolarización a diferencia de aquellos sensibles al Mg^{++} , que requieren de potenciales superiores los $-40mV$ para su activación (Kutsuwada, et al., 1992). Nuestros resultados demuestran que la retina y el cerebelo expresan aproximadamente 2.5 veces más NR2C que el cerebro, cuyos niveles de expresión son apenas detectables (Figura 15). Estos datos coinciden con un estudio previo en el que se determinó por western blot que la retina de pollo expresa la subunidad NR2C (Cristovao, et al., 2002). Sin embargo, en este estudio no se determinó en qué tipos celulares se expresa, ni se compararon los niveles de expresión con otras áreas del SNC (Cristovao, et al., 2002). Es importante mencionar que la expresión de esta subunidad sólo se ha reportado en el cerebelo y en la retina de la rata, pero no en la retina de ratón (Watanabe, et al., 1994). Brandstätter y cols. demostraron por hibridación *in situ* la unión de una sonda dirigida a esta subunidad tanto en la GCL como en la INL, atribuyendo esta señal a las células ganglionares, amacrinas y bipolares (Brandstätter, et al., 1994). Gründer y cols. utilizando inmunohistoquímica confirmaron estos resultados, pero además sugieren que las células de Müller expresan NR2C en menor medida (Gründer, et al., 2000). Existe controversia acerca de la presencia de receptores para NMDA en las células bipolares, puesto que a pesar de haberse detectado la expresión de las subunidades NR1, NR2C, y NR2D por inmunohistoquímica, no ha sido posible registrar corrientes inducidas por NMDA en estas células (Thoreson y Miller, 1993). Puesto que la GCL es la capa de la retina con mayor inmunoreactividad para NR2C, se esperaba que la insensibilidad al Mg^{++} de los NMDARs en las células ganglionares fuera general. Sin embargo, en la retina de rata se ha demostrado que estos receptores son altamente sensibles al bloqueo por Mg^{++} (Aizenman y Lipton, 1988), en tanto que en estudios electrofisiológicos en células ganglionares de retina de anfibio se demostró baja sensibilidad a este catión (Gottesman y Miller, 1992). Una posible explicación es que existan distintas subpoblaciones de células ganglionares con receptores

heteroméricos diferentes: células con receptores NR1-NR2C y células con receptores que además contengan NR2A, ya que se ha demostrado que los heterómeros que contienen NR1-NR2A-NR2C son sensibles al bloqueo por Mg^{++} (Cathala, et al., 2000). Otra característica de los receptores que contienen la subunidad NR2C es que son insensibles a la estimulación por espermina, dependiente de glicina. La expresión de la subunidad NR2C en la retina aunada a la de variantes de NR1 que incluyen casete N1 explica, por lo menos en parte, por qué en la retina las poliaminas inhiben la unión de la glicina al receptor en tanto que en el cerebro se observa lo contrario (Calderón y López-Colomé, 1998).

4. Expresión de NR2D.

Los NMDARs que contienen NR2D son, al igual que aquellos que contienen NR2C, receptores de baja conductancia, alta afinidad por glutamato y glicina, y poca sensibilidad al Mg^{++} . Adicionalmente, los receptores que contienen esta subunidad presentan una constante de desactivación de 1.3 segundos, y su expresión es transitoria durante el DE del cerebro (Monyer, et al., 1994). Nuestros resultados demuestran que NR2D no se expresa en la retina diferenciada, y su nivel de expresión en cerebro y en cerebelo es apenas detectable (Figura 16). En la retina de rata y de ratón adultos, inicialmente no se detectó la expresión de NR2D por la técnica de hibridación *in situ* (Brandstätter, et al., 1994) (Watanabe, et al., 1994). Sin embargo, posteriormente, utilizando técnicas de inmunocitoquímica se determinó que esta subunidad se expresa en la parte interna de la IPL de la retina de rata, lo que sugiere su expresión en células bipolares de bastón (Gründer, et al., 2000); este dato se ha corroborado en la retina de conejo (Wenzel, et al., 1997). Nosotros no detectamos la expresión de NR2D utilizando RT-PCR que es una técnica mucho más sensible que la hibridación *in situ*, sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que esta subunidad se exprese en niveles bajos y únicamente en un tipo celular.

III. Expresión de las subunidades del NMDAR durante el desarrollo embrionario de la retina.

Además de su función como neurotransmisor, el glutamato funciona como factor trófico, y se relaciona con la división y la diferenciación celular durante el DE (Michaelis, 1998). Asimismo juega un papel importante en el proceso de muerte celular programada que es indispensable para el establecimiento de circuitos neuronales en la retina (lentile, et al., 2001). Al respecto, se ha demostrado que la entrada de Ca^{2+} a través de los NMDARs induce la formación de óxido nítrico, que actúa como mensajero retrógrado en el refinamiento de las conexiones sinápticas en el cerebro (Cogen y Cohen-Cory, 2000) y la retina (Anand, et al., 1985, López-Colomé y López-Hernandez, 2003).

La expresión de los NMDARs durante el DE se ha estudiado en diferentes modelos animales (Watanabe, et al., 1994, Gründer, et al., 2000), incluido el pollo (Somohano, et al., 1988, Bredariol y Hamassaki-Britto, 2001, Cristovao, et al., 2002), sin embargo, ninguno de estos estudios ha abordado la expresión diferencial de las variantes por empalme alternativo de NR1, y en el único estudio que aborda la expresión de NR2, no es posible discernir entre la expresión de NR2A y NR2B y no se exploró la expresión de NR2D. Por lo tanto es pertinente analizar el perfil de expresión de las subunidades del NMDAR en el DE de la retina de pollo.

A. Expresión de la subunidad NR1 durante el desarrollo embrionario.

1. Variantes del extremo N-terminal de NR1.

Este trabajo demuestra que NR1 se expresa ya en la fase del DE (E8) caracterizada por una activa proliferación celular (Fig. 8B; Mey y Thanos, 2000). En esta etapa se expresan variantes de NR1 que carecen del exón 5 (casete N1) e incluyen al exón 21 (casete C1). Durante la etapa de diferenciación, el patrón de expresión de NR1 cambia a variantes que contienen los casetes N1, y C3, y disminuye la expresión de isoformas que contienen casete C1, patrón que prevalece en la retina madura.

La expresión de NR1 con el exón 5 aumenta progresivamente en la retina a partir de E8 y alcanza su expresión máxima en E17, misma que se mantiene en el adulto (Fig.

9B). La inclusión del casete N1 confiere a los receptores mayor permeabilidad al calcio a los NMDARs que lo contienen. La expresión de isoformas que contienen N1 coincide con la aparición de los potenciales del receptor y la formación de sinapsis en la capa plexiforme interna (Hanawa, *et al.*, 1976, Mey y Thanos, 2000), que se presenta en forma paralela a la elevación del calcio intracelular inducida por NMDA en la retina de pollo (Fig. 9B; Sugioka, *et al.*, 1998). Los NMDARs que incluyen esta subunidad tienen menor sensibilidad a los agonistas y a la inhibición por protones. La inclusión de esta NR1 concuerda con datos anteriores de nuestro grupo que demuestran un aumento significativo en la unión específica de NMDA-H³ durante el DE de la retina de pollo que alcanza un máximo en E18 (Somohano, *et al.*, 1988), en paralelo con cambios en la potencia de los antagonistas competitivos del receptor (López-Colomé y Somohano, 1989).

La variación en la expresión de las isoformas del extremo N-terminal de NR1 en el DE podría relacionarse con un aumento en el control de la concentración intracelular de calcio, requerido para el aumento de la eficacia sináptica (Scheetz y Constantine-Paton, 1994). Estas características, sumadas a la aparición de NR2A y proteínas quelantes de calcio en la semana final del DE (Ellis, *et al.*, 1991), podrían jugar un papel importante en el control de la entrada de calcio a las neuronas de la retina inducido por la liberación tónica del glutamato en este tejido (Nakanishi, *et al.*, 1998).

2. Variantes de NR1 en el extremo C-terminal.

Durante la estratificación de la retina, la organización estructural de los receptores y moléculas transductoras es importante para el establecimiento y consolidación de las conexiones sinápticas.

Encontramos que la expresión del mRNA para NR1 con casete C1, que interviene en el agrupamiento de los NMDARs y su interacción con neurofilamentos, es máxima al E17 (Fig. 3B), fase en que se completa la estratificación de la retina, y se registran las primeras respuestas eléctricas inducidas por luz, lo que implica la transducción de impulsos a través de receptores de glutamato localizados en la membrana (Mey y Thanos, 2000).

Los dominios PDZ juegan un papel esencial en la localización membranal y la interacción de los NMDARs con las proteínas de la densidad postsináptica; sin embargo, demostramos que no existen sitios de interacción con dominios PDZ en la NR1 del pollo. El que la secuencia del cDNA de NR1 de pato carezca también de estos dominios (Kurosawa, *et al.*, 1994), implica que la regulación de la expresión membranal y la localización sináptica de los NMDARs en la retina de las aves se lleva a cabo mediante dominios diferentes de la proteína, y posiblemente involucra interacciones entre las subunidades que no han sido aclaradas. Sin embargo, la variación específica de las subunidades NR1 con diferente estructura en el C-terminal sugiere que esta región juega un papel importante en la regulación fisiológica del receptor.

El refinamiento de las conexiones sinápticas en la retina que se lleva a cabo entre E13 y P3 es un fenómeno complejo que incluye la generación de ondas de actividad independiente de la luz, así como la eliminación natural de neuronas en el sistema visual (Mey y Tanos, 2000). Se ha demostrado que el incremento de la concentración de calcio intracelular mediado por los receptores NMDA y no-NMDA interviene en ambos procesos (Clarke, 1992, Wong, 1999). Dado que la permeabilidad de los NMDARs al calcio depende de su composición heteromérica, la expresión restringida de la variante de NR1 con C3 durante este período (Figura 10), podría relacionarse con estos procesos. La futura caracterización de los NMDARs que contienen esta variante se requiere para aclarar esta pregunta.

Los resultados de este estudio demuestran claramente que existen diferencias estructurales entre los NMDARs de la retina y del cerebro, responsables de las diferencias funcionales identificadas entre ambos tejidos. Asimismo, abren la posibilidad de mecanismos alternativos para el control de la expresión membranal de estas proteínas en las diferentes especies de vertebrados.

B. Expresión de NR2 en el desarrollo embrionario de la retina.

1. Expresión de NR2A y NR2B.

La expresión de las subunidades NR2A y NR2B en el desarrollo del SNC está en correlación estrecha. La subunidad NR2B es característica de receptores de

neuronas jóvenes, en las que los contactos sinápticos no han sido consolidados, en tanto que NR2A comienza su expresión tardíamente y se inserta en los heterómeros que contienen NR2B, para posteriormente ser la subunidad predominante en los receptores postsinápticos en la madurez (Cull-Candy, et al., 2001). Los NMDARs en etapas tempranas del desarrollo son receptores de alta afinidad y conductancia cuyas propiedades coinciden con la presencia de la subunidad NR2B. Por otra parte, los receptores que contienen NR2A presentan una afinidad y conductancia menor lo que correlaciona con lo observado en el hipocampo de la rata adulta (Monyer, et al., 1994). Se ha demostrado en las neuronas del núcleo geniculado lateral, primer relevo de la retina hacia la corteza visual, un intercambio de NR2B por NR2A en el DE, que requiere de actividad eléctrica en la retina para que se produzca (Ramoia, et al., 1997). Nuestros resultados demuestran que al igual que en el cerebro, la retina expresa primordialmente NR2B en las primeras etapas del desarrollo, en tanto que la retina adulta expresa principalmente NR2A. Es notable el aumento dramático de la expresión de la subunidad NR2A entre E13 y E17, periodo en el cual se lleva a cabo la estratificación de la retina y la consolidación de las primeras sinapsis. Durante este periodo se registran las primeras corrientes de Ca^{++} evocadas por la estimulación de los NMDARs (Sugioka, et al., 1998) y se determinó un incremento de estos receptores en membranas de retina (Somohano, et al., 1988). Nuestros resultados coinciden con los estudios realizados tanto en la rata como en el ratón (Gründer, et al., 2000, Watanabe, et al., 1994) que demuestran el predominio de NR2B en etapas tempranas del desarrollo y la inducción posterior de NR2A. En el estudio en el que se determinó la expresión de NR2A y NR2B en la retina de pollo se describe un aumento sostenido de la expresión de ambas subunidades desde E8 hasta P1, que es consistente con nuestros resultados (Cristovao, et al., 2002). Estos datos sugieren que en la retina, al igual que en otras regiones del SNC, el recambio de NR2B por NR2A es dependiente de la actividad.

2. Expresión de NR2C y NR2D

Los receptores que contienen las subunidades NR2C y NR2D son receptores de alta afinidad por el glutamato, baja conductancia y sensibilidad al Mg^{++} . Sin embargo

existen diferencias importantes entre ellos: la expresión de NR2D se restringe al periodo de maduración del cerebro y desaparece en el estado adulto, en tanto que NR2C sólo se expresa en etapas avanzadas del DE (Monyer, et al., 1994). Adicionalmente, los receptores que contienen NR2D son extrasinápticos, en tanto que la expresión de NR2C es sináptica (Cull-Candy, et al., 2001). Es importante señalar que estas subunidades se expresan primordialmente en receptores triheteroméricos NR1-NR2B-NR2D y NR1-NR2A-NR2C, (Brickley, et al., 2003, Cathala, et al., 2000). Adicionalmente, la expresión de la subunidad NR2C sólo se ha demostrado en el cerebelo, mientras que en la retina de roedores la expresión de estas dos subunidades es bastante controvertida. La subunidad NR2C no se ha detectado en la retina de ratón, en tanto que la expresión de NR2D en la retina de rata se detectó por inmunohistoquímica pero no por hibridación *in situ* (Gründer, et al., 2000, Brandstätter, et al., 1994, Watanabe, et al., 1994). Nuestros resultados demuestran que contrariamente a lo que se ha demostrado en el cerebelo y en la retina de rata (Cull-Candy, et al., 1998, Gründer, et al., 2000), la retina de pollo expresa NR2C de manera constante durante el DE. Estos resultados coinciden con un estudio previo en el que se determinó la expresión de esta subunidad por western blot (Cristovao, et al., 2002). Sin embargo, a diferencia del mRNA, la expresión de proteína se incrementa ligeramente en etapas postnatales. Esta diferencia podría deberse a los mecanismos que regulan tanto la traducción como la expresión de los receptores en la membrana. La expresión sostenida de la subunidad NR2C a lo largo del DE de la retina sugiere un papel importante en la función de los receptores en este tejido.

La expresión de NR2D en la retina de pollo es al igual que en el cerebro de rata, transitoria y limitada al periodo de maduración del tejido (Monyer, et al., 1994). La Figura 16 muestra que en etapas tempranas esta subunidad se expresa de manera importante y disminuye su expresión en E13, cuando comienza el periodo de estratificación de la retina, por lo que es posible que la disminución en la expresión de esta subunidad sea consecuencia de un aumento en la actividad sináptica. Los receptores que contienen NR2D son de muy alta afinidad, poco sensibles al bloqueo por Mg^{++} y sobre todo tienen una constante de desactivación muy alta (Vicini, et al.,

1998). Cuando las conexiones sinápticas se refinan, la entrada de Ca^{++} a través de los NMDARs debe ser controlada, por lo que la inclusión de NR2D en los receptores sinápticos podría generar daño excitotóxico por glutamato. Se ha sugerido que esta subunidad podría estar involucrada en la consolidación de la vía de los bastones, puesto que en ensayos inmunohistoquímicos en la retina de rata se determinó que la expresión de NR2D se limita a la parte externa de la IPL y a algunas células ganglionares (Gründer, et al., 2000). Asimismo, se ha demostrado que las células bipolares de bastón de conejo son inmunopositivas a esta subunidad (Wenzel, et al., 1997). Sin embargo el papel de los NMDARs en la vía de los bastones no está claro ya que las células bipolares de bastón son de tipo ON y su respuesta a la luz está mediada por mGluR6 (Thoreson y Witkovsky, 1999).

CONCLUSIONES

- I. La retina madura expresa variantes de NR1 distintas de las expresadas en el cerebro.
 - a. La retina expresa isoformas que contienen el casete N1, a diferencia del cerebro donde NR1, en general, carece de este casete. La inclusión de N1 reduce la afinidad del receptor por los agonistas, y modifica la afinidad por los antagonistas. Estas isoformas no presentan potenciación por poliaminas, o Zn^{++} . Estos resultados contribuyen a explicar las diferencias bioquímicas encontradas en la retina.
 - b. La retina expresa variantes en el extremo C-terminal de NR1 distintas de las del cerebro. En particular demostramos la expresión de isoformas que contienen un casete nuevo (C3) que codifica para un posible sitio de fosforilación por la cinasa de caseína II que podría ser importante en la regulación de la actividad del receptor. La expresión de las variantes de empalme alternativo en el extremo C-terminal está involucrada en la inserción en la membrana de la subunidad NR1, y puesto que encontramos diferencias importantes tanto en la secuencia del casete C2 como C3, sugerimos que los mecanismos de transporte y anclaje en la membrana de las NR1 deben ser distintos entre especies.

- II. La retina diferenciada expresa las subunidades NR2A, NR2B y NR2C pero no NR2D. Estos resultados demuestran diferencias en el perfil de expresión de NR2 descrito para la rata y el ratón.

Los resultados que hemos obtenido sugieren que las diferencias farmacológicas de la retina podrían deberse, por lo menos en parte, a la expresión diferencial de isoformas de NR1 con respecto al cerebro. Sin embargo, las subunidades de la familia NR2 son indispensables para la determinación de las características farmacológicas de estos receptores. Puesto que la retina madura expresa tanto NR2A como NR2B y NR2C, hace falta un análisis más detallado de los receptores

para determinar tanto el ensamble heteromérico que le confiere a los NMDARs en la retina sus características particulares, como su localización celular.

- III. En etapas tempranas predomina la expresión de isoformas de NR1 que carecen de casete N1 y presentan casete C2 así como subunidades NR2B y NR2D. A medida que se establecen los primeros contactos sinápticos el perfil va cambiando para incluir una mayor proporción de isoformas de NR1 que contiene casete N1, y C3, así como subunidad NR2A.
- IV. A diferencia del cerebelo y la retina de rata, en la retina de pollo la subunidad NR2C se expresa de manera constante a lo largo del DE.

Nuestros resultados demuestran que durante el DE de la retina se llevan a cabo cambios en la composición heteromérica de los NMDARs, que coinciden con las variaciones necesarias para llevar a cabo un control estricto de la concentración intracelular de Ca^{++} , indispensable para el incremento de la eficacia sináptica.

RELEVANCIA

Estudios previos han demostrado que los NMDARs de la retina difieren de los descritos en el SNC y sufren cambios en sus propiedades bioquímicas y farmacológicas durante el desarrollo embrionario (DE), lo que podría explicar la falta de efecto, en la retina, de fármacos que protegen a las neuronas del cerebro de la muerte producida por excitotoxicidad. Con objeto de explicar molecularmente estas diferencias analizamos la expresión de las variantes de empalme de NR1, y de las subunidades NR2 en la retina diferenciada de pollo, así como su variación durante el DE. Nuestros resultados demuestran que los NMDARs de la retina difieren de los del SNC tanto por la inclusión de la subunidad NR2C, como por diferencias en la expresión de las variantes de empalme alternativo de NR1. Asimismo, demostramos que existen diferencias en el perfil de expresión de las subunidades del NMDAR que contribuyen a explicar las diferencias tanto fisiológicas como farmacológicas observadas a lo largo del desarrollo embrionario de la retina.

La inclusión del casete N1 en los receptores en la subunidad NR1 del receptor explica las diferencias en las propiedades del sitio del coagonista (glicina) y la acción de las poliaminas sobre el mismo en ambos tejidos. Asimismo, la expresión de la subunidad NR2C en los receptores tiene un efecto negativo sobre la afinidad por los agonistas y, sobre todo, es responsable de disminución en la sensibilidad al bloqueo por Mg^{++} . El efecto de la expresión de esta subunidad en las células ganglionares de la retina no es claro puesto que los estudios que abordan la sensibilidad al Mg^{++} en estas células son contradictorios (Gottesman y Miller, 1992; Aizenman y Lipton, 1988). Al analizar la secuencia del extremo carboxilo de NR1 demostramos que carece de los dominios de interacción caracterizados en los mamíferos, y en cambio, posee una secuencia de N-miristoilación, lo que sugiere un mecanismo diferente de transporte y anclaje de los NMDARs a la membrana en las aves. Identificamos una nueva variante de empalme de NR1 generada por la inclusión de un exón no descrito previamente (C3), cuyo perfil de expresión coincide con el período crítico de formación de sinapsis en la retina. Los receptores que contienen esta subunidad podrían jugar un papel importante en el proceso de consolidación sináptica.

La variación de los NMDARs durante el DE de la retina puede servir como modelo para el estudio y análisis de los mecanismos que controlan el recambio de subunidades de los NMDARs y consecuentemente el ajuste de sus propiedades a los cambios genéticos y epigenéticos que caracterizan la plasticidad durante el DE y el SN diferenciado. La retina de pollo resulta un modelo interesante puesto que expresa de manera orquestada todas las isoformas de NR1 y todas las subunidades de tipo NR2. El análisis de los mecanismos que regulan los cambios en la expresión de estos receptores es de gran importancia para el diseño de tratamientos eficaces, puesto que se han observado diferencias en la composición de los receptores en padecimientos que van, desde el trauma en el nervio óptico (Kreutz, et al., 1998), hasta la enfermedad de Alzheimer (Bi y Sze, 2002).

BIBLIOGRAFIA

Adler, R. y Farber, D. (1986). *The Retina: A model for cell biology studies*, Academic Press. Orlando, USA

Aizenman, E. y Lipton, S. A.(1988) Responses mediated by excitatory amino acid receptors in solitary retinal ganglion cells from rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85** (17):6556-6560

Alagarsamy, S., Sorensen, S. y Conn, P.(2001) Coordinate regulation of metabotropic glutamate receptors. *Curr. Op. Neurobiol.* **11** 357-362

Anand, H., Roberts, P. J. y López-Colomé, A. M.(1985) Excitatory amino acids in the chick retina: possible involvement of cyclic guanosine monophosphate. *Neurosci Lett.* **58** (1):31-36.

Angelatoy, F., Kouvelas, E. D. y Voukelatou, G.(1986) Na⁺-independent L-aspartate binding sites in chick brain. *International Journal of Developmental Neuroscience.* **4** (4):339-352

Barber, A. J.(2003) A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.* **27** (2):283-290

Barnstable, C. J. (1993) Glutamate and GABA in retinal circuitry. *Curr Opin Neurobiol* **3** (4):520-5.

Barria, A. y Malinow, R.(2002) Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. *Neuron.* **35** (2):345-353

Benveniste, M. y Mayer, M. L.(1993) Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *J Physiol.* **464** 131-163.

Bi, H. y Sze, C.(2002) N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A and NR2B messenger RNA levels are altered in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* **200** (1-2):11-18

Boje, K. M., Skolnick, P., Raber, J., Fletcher, R. T. y Chader, G.(1992) Strychnine-insensitive glycine receptors in embryonic chick retina: characteristics and modulation of NMDA neurotoxicity. *Neurochem Int.* **20** (4):473-486.

Bottai, D., Maler, L. y Dunn, R. J.(1998) Alternative RNA splicing of the NMDA receptor NR1 mRNA in the neurons of the teleost electrosensory system. *J Neurosci.* **18** (14):5191-5202.

Brandstätter, J. H., Koulen, P. y Wässle, H.(1998) Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Res.* **38** (10):1385-1397.

Brandstätter, J. H., Hartveit, E., Sassoe-Pognetto, M. y Wässle, H.(1994) Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur J Neurosci.* **6** (7):1100-1112.

Bredariol, A. S. d. S. y Hamassaki-Britto, D.(2001) Ionotropic glutamate receptors during the development of the chick retina. *J Comp Neurol.* **441** (1):58-70

Brickley, S., Misra, C., Mok, M., Mishina, M. y Cull-Candy, S.(2003) NR2B and NR2D subunits coassemble in cerebellar golgi cells to form a distinct NMDA receptor subtype restricted to extrasynaptic sites. *J. Neurosci.* **23** (12):4958-4966

Buller, A. L., Larson, H. C., Schneider, B. E., Beaton, J. A., Morrisett, R. A. y Monaghan, D. T.(1994) The molecular basis of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition. *J Neurosci.* **14** (9):5471-5484.

Calderón, F. y López-Colomé, A. M.(1998) Spermine inhibits [3H]glycine binding at the NMDA receptors from plexiform layers of chick retina. *Neurochem Res.* **23** (11):1363-1369.

Carroll, R. C. y Zukin, R. S.(2002) NMDA-receptor trafficking and targeting: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends in Neurosciences.* **25** (11):571-577

Cathala, L., Misra, C. y Cull-Candy, S.(2000) Developmental profile of the changing properties of NMDA receptors at cerebellar mossy fiber-granule cell synapses. *J Neurosci.* **20** (16):5899-5905.

Ciabarra, A. M., Sullivan, J. M., Gahn, L. G., Pecht, G., Heinemann, S. y Sevarino, K. A.(1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci.* **15** (10):6498-6508.

Clarke, P. G.(1992) Neuron death in the developing avian isthmo-optic nucleus, and its relation to the establishment of functional circuitry. *J Neurobiol.* **23** (9):1140-1158.

Cogen, J. y Cohen-Cory, S.(2000) Nitric oxide modulates retinal ganglion cell axon arbor remodeling in vivo. *J Neurobiol.* **45** (2):120-133.

Conn, P., Boss, V. y Chung, D.(1994). Second messenger systems coupled to metabotropic Glutamate receptors.The metabotropic glutamate receptors.(Byland, D.),277.Humana Press,Totowa, NJ

Cristovao, A. J., Oliveira, C. R. y Carvalho, C. M. (2002) Expression of functional N-methyl-D-aspartate receptors during development of chick embryo retina cells: in vitro versus in vivo studies. *Brain Res Mol Brain Res.* **99** (2):125-133.

Cull-Candy, S., Brickley, S. y Farrant, M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology.* **11** (3):327-335

Cull-Candy, S. G., Brickley, S. G., Misra, C., Feldmeyer, D., Momiyama, A. y Farrant, M.(1998) NMDA receptor diversity in the cerebellum: identification of subunits contributing to functional receptors. *Neuropharmacology.* **37** (10-11):1369-1380

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

Chalupa LM, Gunhan E. (2004) Development of On and Off retinal pathways and retinogeniculate projections. *Prog Retin Eye Res.* **23**(1):31-51

Das, S., Sasaki, Y. F., Rothe, T., Premkumar, L. S., Takasu, M., Crandall, J. E., Dikkes, P., Conner, D. A., Rayudu, P. V., Cheung, W., Chen, H. S., Lipton, S. A. y Nakanishi, N.(1998) Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature.* **393** (6683):377-381.

Daw, N. W., Brunken, W. J. y Parkinson, D.(1989)The function of synaptic transmitters in the retina.*Annual Review of Neuroscience.* **12** 205-225

Dawson, V. L., Dawson, T. M., Bartley, D. A., Uhl, G. R. y Snyder, S. H.(1993) Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *Journal of Neuroscience.* **13** (6):2651-2661

DeVries, S. H.(2000) Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. *Neuron*. **28** (3):843-856

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. y Traynelis, S. F.(1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*. **51** (1):7-61.

Dixon, D. B. y Copenhagen, D. R.(1992) Two types of glutamate receptors differentially excite amacrine cells in the tiger salamander retina. *Journal of Physiology*. **449** 589-606

Dunah, A. W., Luo, J., Wang, Y. H., Yasuda, R. P. y Wolfe, B. B.(1998) Subunit composition of N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system that contain the NR2D subunit. *Mol Pharmacol*. **53** (3):429-437.

Durand, G. M., Bennett, M. V. y Zukin, R. S.(1993) Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90** (14):6731-6735.

Durand, G. M., Gregor, P., Zheng, X., Bennett, M. V., Uhl, G. R. y Zukin, R. S.(1992) Cloning of an apparent splice variant of the rat N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR1 with altered sensitivity to polyamines and activators of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89** (19):9359-9363.

Ehlers, M. D., Zhang, S., Bernhardt, J. P. y Huganir, R. L.(1996) Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell*. **84** (5):745-755.

Ehlers, M. D., Fung, E. T., O'Brien, R. J. y Huganir, R. L.(1998) Splice variant-specific interaction of the NMDA receptor subunit NR1 with neuronal intermediate filaments. *J Neurosci*. **18** (2):720-730.

Ellis, J. H., Richards, D. E. y Rogers, J. H.(1991) Calretinin and calbindin in the retina of the developing chick. *Cell Tissue Res.* **264** (2):197-208.

Fletcher, E. L.(2000) Alterations in neurochemistry during retinal degeneration. *Microscopy Research & Technique.* **50** (2):89-102

Fletcher, E. L., Hack, I., Brandstatter, J. H. y Wassle, H.(2000) Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *J Comp Neurol.* **420** (1):98-112.

Frade JM, Bovolenta P, Martinez-Morales JR, Arribas A, Barbas JA, Rodriguez-Tebar A. (1997) Control of early cell death by BDNF in the chick retina. *Development.* **124**(17):3313-3320.

Goodman, C. y Shatz, C.(1993) Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell.* **72 Supp** 77-98

Gottesman J, y Miller RF. (1992) Pharmacological properties of N-methyl-D-aspartate receptors on ganglion cells of an amphibian retina. *J Neurophysiol.* **68**(2):596-604.

Gründer, T., Kohler, K. y Guenther, E.(2001) Alterations in NMDA receptor expression during retinal degeneration in the RCS rat. *Visual Neuroscience.* **18** (5):781-787

Gründer, T., Kohler, K., Kaletta, A. y Guenther, E.(2000) The distribution and developmental regulation of NMDA receptor subunit proteins in the outer and inner retina of the rat. *J Neurobiol.* **44** (3):333-342.

Hamburger V, Hamilton HL. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**:49-92

Hanawa, I., Takahashi, K. y Kawamoto, N.(1976) A correlation of embryogenesis of visual cells and early receptor potential in the developing retina. *Exp Eye Res.* **23** (6):587-594

Hardingham, G. E. y Bading, H.(2002) Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1600** (1-2):148-153

Hattar, S., Takao, M., Berson, D. M., Foster, R. G. y Yau, K. W. (2003) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science.* **299** (5604):245-247

Heft, M. W., Dionne, R. A., Jeffcoat, M. K., Alfano, M. C., Valachovic, R. W., Lipton, J. A. y Lipton, S. A. (2003) Possible role for memantine in protecting retinal ganglion cells from glaucomatous damage. *Journal of Dental Education.* **67** (6):622-629

Hestrin, S.(1992) Developmental regulation of NMDA receptor-mediated synaptic currents at a central synapse. *Nature.* **357** (6380):686-689

Hinton DR, Sadun AA, Blanks JC, Miller CA. (1986) Optic-nerve degeneration in Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* **315**(8):485-7.

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

Hollmann, M., Boulter, J., Maron, C., Beasley, L., Sullivan, J., Pecht, G. y Heinemann, S.(1993) Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron.* **10** (5):943-954.

Hughes WF, McLoon SC. (1979) Ganglion cell death during normal retinal development in the chick: comparisons with cell death induced by early target field destruction. *Exp Neurol.* **66**(3):587-601

lentile, R., Macaione, V., Teletta, M., Pedale, S., Torre, V. y Macaione, S.(2001) Apoptosis and necrosis occurring in excitotoxic cell death in isolated chick embryo retina. *J Neurochem.* **79** (1):71-78.

Itzstein, C. y Espinosa, L.(2001) Molecular identification of NMDA glutamate receptors expressed in bone cells. *Journal of Bone & Mineral Research.* **16** (9):1728-1729; author reply 1731-1722

Kashiwagi, K., Masuko, T., Nguyen, C., Kuno, T., Tanaka, I., Igarashi, K. y Williams, K.(2002) Channel blockers acting at N-methyl-D-aspartate receptors: differential effects of mutations in the vestibule and ion channel pore. *Mol Pharmacol.* **61** (3):533-545

Kleckner, N. y Dingledine, R.(1991)Regulation of hippocampal NMDA receptors by magnesium and glycine during development. *Brain Res Mol Brain Res.* **11** (2):151-159

Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B. y Seeburg, P. H.(1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science.* **269** (5231):1737-1740.

Kreutz, M. R., Bockers, T. M., Bockmann, J., Seidenbecher, C. I., Kracht, B., Vorwerk, C. K., Weise, J. y Sabel, B. A.(1998) Axonal injury alters alternative splicing of the retinal NR1 receptor: the preferential expression of the NR1b isoforms is crucial for retinal ganglion cell survival. *J Neurosci.* **18** (20):8278-8291.

Kuenzel, E. A., Mulligan, J. A., Sommercorn, J. y Krebs, E. G.(1987) Substrate specificity determinants for casein kinase II as deduced from studies with synthetic peptides. *J Biol Chem.* **262** (19):9136-9140.

Kurosawa, N., Kondo, K., Kimura, N., Ikeda, T. y Tsukada, Y.(1994) Molecular cloning and characterization of avian N-methyl-D-aspartate receptor type 1 (NMDA-R1) gene. *Neurochem Res.* **19** (5):575-580.

Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M. y et al.(1992) Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature.* **358** (6381):36-41.

Laurie, D. J. y Seeburg, P. H.(1994) Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *J Neurosci.* **14** (5 Pt 2):3180-3194.

Laurie, D. J., Putzke, J., Zieglansberger, W., Seeburg, P. H. y Tolle, T. R.(1995) The distribution of splice variants of the NMDAR1 subunit mRNA in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* **32** (1):94-108.

Lelong, I. H., Zhang, J., Cardarelli, C. O., Gottesman, M. M., Pastan, I. y Gottesman, J.(1992) Pharmacological properties of N-methyl-D-aspartate receptors on ganglion cells of an amphibian retina. *Proc.Natl Acad Sci U S A.* **89** (18):8472-8476

Leonard, A. S. y Hell, J. W.(1997) Cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites. *J Biol Chem.* **272** (18):12107-12115.

Leonard, A. S., Lim, I. A., Hemsworth, D. E., Horne, M. C. y Hell, J. W.(1999) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N- methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96** (6):3239-3244.

Lieberman, D. N. y Mody, I.(1999) Casein kinase-II regulates NMDA channel function in hippocampal neurons. *Nat Neurosci.* **2** (2):125-132.

Lombardi, G. y Moroni, F.(1994) Glutamate receptor antagonists protect against ischemia-induced retinal damage. *Eur J Pharmacol.* **271** (2-3):489-495.

López-Colomé, A. y López-Hernandez, E.(2003) Glutamate receptors coupled to nitric oxide synthesis in embryonic retina. *Dev. Neurosci.* **25** (293-300):

López-Colomé A. M. y Lee I (1996) Pharmacological characterization of inositol-1,4,5,-trisphosphate binding to membranes from retina and retinal cultures. *J Neurosci Res.* **44**(2):149-56.

López-Colomé, A. M.(1981) High affinity binding of L-glutamate to chick retinal membranes. *Neurochemical Research.* **6** (9):1019-1033

López-Colomé, A. M.(1986) Excitatory amino acids.(143-157.McMillan Press,London

López-Colomé, A. M. y Somohano, F.(1989) Developmental changes in the specificity of excitatory amino acid receptors in the retina.Extracellular and intracellular messengers in the vertebrate retina. Alan Liss Inc.,New York, NY

López-Colomé, A. M. y Somohano, F.(1992) N-methyl-D-aspartate receptors in the retina: 3-[(+/-)-2- carboxypiperazin- 4-yl]-propyl-1-phosphonic acid (CPP) binding studies. *Neuropharmacology.* **31** (6):577-584.

Masland, R. H.(1988) Amacrine cells. *Trends in Neurosciences.* **11** (9):405-410

Masland, R. H.(2001) The fundamental plan of the retina: Neuronal diversity in the retina. *Nature Neuroscience.* **4** (9):877-886

Massey, S. y Maguire, G.(1995) The role of glutamate in retinal circuitry, en Excitatory aminoacids and synaptic transmission..Academic Press,New York201-221

Massey, S. C. y Miller, R. F.(1990) N-methyl-D-aspartate receptors of ganglion cells in rabbit retina. *J Neurophysiol.* **63** (1):16-30.

Matsuda, K., Fletcher, M., Kamiya, Y. y Yuzaki, M.(2003) Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *J Neurosci.* **23** (31):10064-10073

McLoon SC, y Barnes RB. (1989) Early differentiation of retinal ganglion cells: an axonal protein expressed by premigratory and migrating retinal ganglion cells. *J Neurosci.*; **9**(4):1424-1432.

Meggio, F., Marin, O. y Pinna, L. A.(1994) Substrate specificity of protein kinase CK2. *Cell Mol Biol Res.* **40** (5-6):401-409

Mey, J. y Thanos, S.(2000) Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res Brain Res Rev.* **32** (2-3):343-379

Michaelis, E. K.(1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol.* **54** (4):369-415.

Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B. y Seeburg, P. H.(1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron.* **12** (3):529-540.

Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B. y Seeburg, P. H.(1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science.* **256** (5060):1217-1221.

Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N. y Nakanishi, S.(1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*. **354** (6348):31-37.

Morrisett, R., Mott, D., Lewis, D., Wilson, W. y Swartzwelder, H.(1990) Reduced sensitivity of the N-methyl-D-aspartate component of synaptic transmission to magnesium in hippocampal slices from immature rats. *Brain Res Dev Brain Res*. **56** (2):257-262

Nakanishi, S., Nakajima, Y., Masu, M., Ueda, Y., Nakahara, K., Watanabe, D., Yamaguchi, S., Kawabata, S. y Okada, M.(1998) Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res Brain Res Rev*. **26** (2-3):230-235.

Newman, E. y Reichenbach, A.(1996) The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends in Neurosciences*. **19** (8):307-312

Okabe, S., Miwa, A. y Okado, H.(1999) Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. *J Neurosci*. **19** (18):7781-7792.

Osborne, N. N., Ugarte, M., Chao, M., Chidlow, G., Bae, J. H., Wood, J. P. y Nash, M. S.(1999) Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Survey of Ophthalmology*. **43 Suppl 1** S102-128

Papadakis, M., Hawkins, L. y Stephenson, F.(2004) Appropriate NR1-NR1 Disulfide-linked Homodimer Formation Is Requisite for Efficient Expression of Functional, Cell Surface N-Methyl-D-aspartate NR1/NR2 Receptors. *J Biol Chem*. **279** (15):14703-14712

Prybylowski, K. L. y Wolfe, B. B.(2000) Developmental differences in alternative splicing of the NR1 protein in rat cortex and cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res.* **123** (2):143-150.

Ramoá, A. S., Stryker, M. P. y Shatz, C. J.(1997) Retinal activity regulates developmental switches in functional properties and ifenprodil sensitivity of NMDA receptors in the lateral geniculate nucleus. *Visual Neuroscience.* **14** (4):779-788

Rodríguez-Contreras, A., Calderón, F. y López-Colomé, A. M.(1998) Strychnine-insensitive [3H] glycine binding to synaptosomal membranes from the chick retina. *Int J Dev Neurosci.* **16** (5):413-421.

Rumbaugh, G. y Vicini, S.(1999) Distinct synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in developing cerebellar granule neurons. *J Neurosci.* **19** (24):10603-10610.

Sans, N., Prybylowski K, Petralia RS, Chang K, Wang YX, Racca C, Vicini S y RJ, W.(2003) NMDA receptor trafficking through an interaction between PDZ proteins and the exocyst complex. *Nat Cell Biol.* **5** (6):520-530

Scott, D. B., Blanpied, T. A., Swanson, G. T., Zhang, C. y Ehlers, M. D.(2001) An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *Journal of Neuroscience.* **21** (9):3063-3072

Scheetz, A. J. y Constantine-Paton, M.(1994) Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neural development. *FASEB Journal.* **8** (10):745-752

Sheng, M.(2002) Molecular organization of the postsynaptic specialization. *Frontiers in Bioscience.* **7** d872-885

Sheperd, G. (1974). The synaptic organization of the brain, Oxford University Press. New York

Somohano, F., Roberts, P. J. y López-Colomé, A. M.(1988) Maturational changes in retinal excitatory amino acid receptors. *Brain Res.* **470** (1):59-67.

Song, I. y Huganir, R.(2002) Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity.*Trends in Neurosciences.* **25** (11):578-588

Standley, S., Roche, K. W., McCallum, J., Sans, N. y Wenthold, R. J.(2000) PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron.* **28** (3):887-898.

Stocca, G. y Vicini, S.(1998) Increased contribution of NR2A subunit to synaptic NMDA receptors in developing rat cortical neurons. *J Physiol.* **507** (Pt 1):13-24.

Subramaniam, S. y McGonigle, P.(1994) Regional profile of developmental changes in the sensitivity of the N- methyl-D-aspartate receptor to polyamines. *J Neurochem.* **62** (4):1408-1415.

Sucher, N. J., Lipton, S. A. y Dreyer, E. B.(1997) Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res.* **37** (24):3483-3493.

Sucher, N. J., Kohler, K., Tenneti, L., Wong, H. K., Grunder, T., Fauser, S., Wheeler-Schilling, T., Nakanishi, N., Lipton, S. A. y Guenther, E.(2003) N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR3A in the retina: developmental expression, cellular localization, and functional aspects. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* **44** (10):4451-4456

Sugioka, M., Fukuda, Y. y Yamashita, M.(1998) Development of glutamate-induced intracellular Ca²⁺ rise in the embryonic chick retina. *J Neurobiol.* **34** (2):113-125.

Sun, D., Rait, J. L., Kalloniatis, M. y Margalit, E.(2003) Inner retinal neurons display differential responses to N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Journal of Comparative Neurology*. **465** (1):38-56

Tenhula WN, Xu SZ, Madigan MC, Heller K, Freeman WR, Sadun AA. (1992) Morphometric comparisons of optic nerve axon loss in acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Ophthalmol*. 113(1):14-20.

Thoreson, W. B. y Miller, R. F.(1993) Membrane currents evoked by excitatory amino acid agonists in ON bipolar cells of the mudpuppy retina. *Journal of Neurophysiology*. **70** (4):1326-1338

Thoreson, W. B. y Witkovsky, P.(1999) Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Progress in Retinal & Eye Research*. **18** (6):765-810

Tingley, W., Ehlers, M., Kameyama, K., Doherty, C., Ptak, J., Riley, C. y Huganir, R.(1997) Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J Biol Chem*. **272** (8):5157-5166

Tingley, W. G., Roche, K. W., Thompson, A. K. y Huganir, R. L.(1993) Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature*. **364** (6432):70-73.

Traynelis, S. F., Hartley, M. y Heinemann, S. F.(1995) Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science*. **268** (5212):873-876.

Vicini, S., Wang, J. F., Li, J. H., Zhu, W. J., Wang, Y. H., Luo, J. H., Wolfe, B. B. y Grayson, D. R.(1998)Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl- D-aspartate receptors.*J Neurophysiol*. **79** (2):555-566.

Vorwerk CK, Hyman BT, Miller JW, Husain D, Zurakowski D, Huang PL, Fishman MC, y Dreyer EB.(1997) The role of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in retinal excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **38**(10):2038-44.

Watanabe, M., Mishina, M. y Inoue, Y.(1994) Differential distributions of the NMDA receptor channel subunit mRNAs in the mouse retina. *Brain Res.* **634** (2):328-332.

Wenthold, R. J., Prybylowski, K., Standley, S., Sans, N. y Petralia, R. S.(2003) Trafficking of NMDA receptors. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology.* **43** 335-358

Wenzel, A., Benke, D., Mohler, H. y Fritschy, J. M.(1997) N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2D subunit in the retina are selectively expressed in rod bipolar cells. *Neuroscience.* **78** (4):1105-1112

Whitmore, D., Cermakian, N., Crosio, C., Foulkes, N. S., Pando, M. P., Travnickova, Z. y Sassone-Corsi, P.(2000) A clockwork organ. *Biol Chem.* **381** (9-10):793-800.

Williams, K., Kashiwagi, K., Fukuchi, J. y Igarashi, K.(1995) An acidic amino acid in the N-methyl-D-aspartate receptor that is important for spermine stimulation. *Mol Pharmacol.* **48** (6):1087-1098

Wong, R. O.(1999) Retinal waves and visual system development.*Annu Rev Neurosci.* **22** 29-47

Yakamura T. y Shimoji K. (1999)Subunit and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Progress in Neurobiology* **59**: 279-298

Zukin, R. S. y Bennett, M. V.(1995) Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci.* **18** (7):306-313.

Developmental Expression of N-Methyl-D-Aspartate Glutamate Receptor 1 Splice Variants in the Chick Retina

I. Lee-Rivera,^{1,2} A. Zarain-Herzberg,² and A.M. López-Colomé^{1,2*}

¹Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México D.F., México

²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, México D.F., México

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the vertebrate retina. The N-methyl-D-aspartate glutamate receptor (NMDAR) is assembled as a tetramer containing NR1 and NR2, and possibly NR3 subunits, NR1 being essential for the formation of the ion channel. The NMDAR1 (NR1) gene encodes for mRNAs that generate at least eight functional variants by alternative splicing of exon 5 (cassette N1), 21 (cassette C1), or 22 (cassettes C2 or C2'). NR1 splice variants were identified in the mature chick retina, and their variation during embryonic development (ED) was analyzed. NR1 was shown to lack N1 in early ED, shifting to N1-containing variants in the mature retina, which could contribute to explaining the distinct biochemical properties of retinal NMDARs compared with the CNS. Sequence analysis of C-terminal variants containing C1 and C2 cassettes suggests a membrane-targeting mechanism for avian NMDARs distinct from that in mammals. An NR1 variant containing a novel alternative C-terminal splice exon named C3 was found, which encodes six amino acids containing a predicted casein kinase II phosphorylation site. This new variant is expressed in the retina during a restricted period of ED, coincident with the generation of spontaneous calcium activity waves, which precedes synapse formation in the retina, suggesting its participation in this process. © 2003 Wiley-Liss, Inc.

Key words: N-methyl-D-aspartate glutamate receptor 1; retina; NR1; NR2

Glutamate (L-Glu) is the main excitatory neurotransmitter in the vertical signaling pathway of the vertebrate retina (Massey and Miller, 1990). N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR), one of the major subtypes of ionotropic glutamate receptors, are calcium-permeable, heterooligomeric, ligand-gated cation channels (Hollmann and Heinemann, 1994), which play an important role in retinal synaptic transmission, particularly at the inner plexiform layer (IPL; Fletcher et al., 2000). Molecular cloning and functional expression studies have shown NMDARs to assemble as tetramers containing NR1 and NR2 (A–D), and in some cases NR3A or NR3B subunits (Hollmann and Heinemann, 1994). The functional diversity of

NMDARs resides in the differential assembly of subunits (Mori and Mishina, 1995). The NR1 subunit is essential for the formation of the ion channel, and it confers sensitivity to glycine. The NR2 subunits confer distinct properties to the receptor, such as peak open probability, sensitivity to glutamate, and response kinetics (Monyer et al., 1992). Although homomeric NR1 channels are functional, the current generated by such receptors is only a small fraction of that generated by heteromeric assemblies of NR1 and NR2 subunits, which has led to the notion that NMDARs in vivo include at least one NR1 subunit and one or more NR2 and/or NR3 subunits (Moriyoshi et al., 1991). The function of the recently described NR3 subunits is to regulate the activity of NR1/NR2 heteromers (Das et al., 1998).

The NR1 gene has been cloned from the rat and includes 22 exons, with at least nine possible splice variant transcripts derived from alternative splicing of pre-mRNA (Hollmann and Heinemann, 1994; Zukin and Bennett, 1995), one of which codes for a truncated protein lacking transmembrane domains, with a stop codon on exon 3, unlikely to be functional. The remaining eight isoforms arise from the insertion or deletion of exons 5 and 21 and/or from the use of an alternative exon/intron acceptor site present within exon 22. To date, seven possible isoforms have been cloned from cDNA libraries (Zukin and Bennett, 1995).

Exon 5 in the rat NR1 gene contains 63 bp and codes for the amino-terminal protein cassette termed N1, an important determinant in the regulation of channel properties such as the sensitivity to spermine, to pH, and to zinc (Dingledine et al., 1999). The 111-bp-long exon 21 encodes the alternatively spliced carboxyl-terminal protein cassette C1, involved in NR1 regulation by protein kinase C (PKC) as well as in the calmodulin-

*Correspondence to: A.M. López-Colomé, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, AP 70-253, México D.F. 04510, Mexico.
E-mail: acolome@ifisiol.unam.mx

Received 14 December 2002; Revised 21 March 2003; Accepted 7 April 2003

independent inhibition of currents (Ehlers et al., 1996). It has also been shown to mediate the clustering of NMDARs and their interaction with neurofilaments (Ehlers et al., 1998). Exon 22 encodes the carboxyl-terminal protein cassette C2; the use of an alternative acceptor site in this exon results in the deletion of the first 356 bp, which gives rise to the protein cassette C2', composed of 22 amino acids. Based on recent studies demonstrating that NR1 splice variants with the shortest C-terminus (lacking C1 and containing C2') show the greatest cell surface expression of homomeric and heteromeric NMDAR channels (Okabe et al., 1999), it has been demonstrated that the C1 cassette carries an ER-retention signal, whereas the C2' cassette contains a PDZ-binding domain that facilitates receptor surface expression (Standley et al., 2000).

The expression of the NMDA receptor subunits has been studied in the mammalian retina using mRNA *in situ* hybridization (Brandstätter et al., 1994; Watanabe et al., 1994) and immunohistochemistry (Fletcher et al., 2000; Gründer et al., 2000). The pattern of NR1 mRNA labeling shows NR1 expression in virtually all neurons within the inner nuclear layer and the ganglion cell layer (GCL), whereas the distribution of the NR2 subunit transcripts is more restricted (Brandstätter et al., 1998). NR2 subunits A–D are expressed in the GCL, NR2D showing the weakest signal. NR2B has been identified in horizontal cells, in addition to the GCL, and NR2C is also present in bipolar cells and in Müller glia (Gründer et al., 2000). The differential expression of NR1 splice variants in the retina has not been explored, although heteromeric receptor properties and activity are highly dependent on the specific NR1 isoforms included (Dingledine et al., 1999) and are an important factor to consider when determining the physiological role of NMDARs in this tissue.

Developmental changes in glutamate responses as well as in ligand-binding sites for glutamate and aspartate have been documented, which could involve alterations in the alternative splicing of NR1 gene that affect channel properties (Laurie and Seeburg, 1994; Laurie et al., 1995; Prybylowski and Wolfe, 2000). Moreover, synaptic receptor heterogeneity is a key factor in the generation of distinct functional properties in retinal neurons, so it becomes important to identify the specific NR1 isoforms expressed and to determine their variations during this process.

Kinetic and pharmacological differences in NMDAR properties in the retina compared with the brain during development have been reported (Somohano et al., 1988), which could be ascribed to the inclusion of NR2C, which is almost exclusive to the retina and the cerebellum (Monyer et al., 1994; Brandstätter et al., 1998). However, properties of recombinant NR1/NR2C receptors (Traynelis et al., 1995) differ from those observed in the retina, particularly those regarding the glycine coagonist-binding site (Rodríguez-Contreras et al., 1998) and the modulation by spermine, which is opposite that observed in the brain (Calderón and López-Colomé, 1998). Because the

precise oligomeric composition of retinal NMDARs is unknown, establishing NR1 splice variants in this tissue could contribute to explain the specific properties of these receptors (López-Colomé and Somohano, 1992; Rodríguez-Contreras et al., 1998; Calderón and López-Colomé, 1998).

The present study is aimed at identifying the NR1 splice variants in the chick retina and their expression during development, using semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis. Our results demonstrate the expression of a novel NR1 splice variant in the chick retina as well as significant differences in the developmental expression of NR1 isoforms compared with that in the brain.

MATERIALS AND METHODS

RNA Extraction

Total RNA was extracted by a modified guanidine isothiocyanate method using Trizol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Three-day-old chicks (PH3) or 200-g male Sprague-Dawley rats were sacrificed by decapitation, and the retina or brain cortex was extracted and pooled into a tissue homogenizer containing Trizol reagent. For those experiments using embryonic tissue, retinas from chick embryos of 8, 10, 13, and 17 days (E8, E10, E13, E17) were collected and processed as described in the provider's protocol. RNA samples were aliquoted and stored at -80°C until use. Concentration and purity of the total RNA was determined by absorbance at 260/280 nm. Integrity of the samples was determined by electrophoresis on formaldehyde-containing agarose gels as previously described (Sambrook and Russell, 2002).

RT-PCR Analysis of NMDAR1 Transcripts

To design the PCR primers, the exonic NR1 rat genomic sequence (Genebank accession No. L08228) was aligned with the duck NR1 cDNA sequence (Genebank accession No. D83352). The nucleotide alignment allowed us to predict the regions that should be alternatively spliced in the duck pre-mRNA. All primers, unless otherwise specified, were designed on regions of the duck sequence highly homologous to the rat gene using the MacVector 6.5.3 software analysis package (Kodak) and further subjected to BLAST analysis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) to confirm their sequence specificity (Table I).

First-strand cDNA templates were synthesized from 2 μg of total RNA samples using random hexamers. Briefly, RNA was incubated at 70°C for 2 min, and 40 pmol of hexamer primers were added. First strand synthesis was performed at 42°C for 1 hr using 100 U of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen Co.), except for the negative control, 0.5 mM of each dNTP, and 10 U of RNase inhibitor (Amersham-Pharmacia Biotech Inc., Piscataway NJ). First-strand buffer contained 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , and 10 mM dithiothreitol (DTT). After cDNA synthesis, samples were incubated with 0.2 U of RNase H (Invitrogen Co.) for 30 min at 37°C . Half of the reaction product was used for amplification with NR1-specific primers and the other half for

TABLE I. DNA Sequence of Primers Used for RT-PCR Amplification and Sequencing Analysis

Primer sequence	Position ^a	Accession No. ^b	Annealing site
5'-GAGCATCCACCTGTCCTTTTTC-3'	855 (F)	D83352	Exon 4
5'-GGGGTCAAACCTGAAGCACTTTCTC-3'	1059 (R)	D83352	Exon 6
5'-GAGTATCCACCTGAGTTTCCTT-3'	826 (F)	L08228	Exon 4
5'-GGGTCAAACCTGCAGCACCTTCT-3'	1070 (R)	L08228	Exon 6
5'-ATGCTGGTGGCTGGAGGTATTG-3'	2908 (F)	D83352	Exon 19
5'-TAGGGTCAGGTTCTGCTCTACCAC-3'	3079 (R)	D83352	Exon 21
5'-GCTCATCAACGGGAAGAATGAATC-3'	1272 (F)	D83352	Exon 8
5'-CGACATCTGATAGCCTTGAGGTTTC-3'	1647 (R)	D83352	Exon 10
5'-CTTGGGTGAGGTATCAGGAGTG-3'	2828 (F)	D83352	Exon 19
5'-GAUGGAUGGCAGUACGUCAG-3'	3390 (R)	D83352	Exon 22
5'-GCCGTTAATGTGTGGAGGAA-3'	3016 (F)	D83352	Exon 20
5'-AGCCTGTCTCTCTGGCACTC-3'	3197 (R)	D83352	Exon 22 C2
5'-GCTGGTGGAAAGATTTCTG-3'	C2' (R)	— ^c	Exon 22 C2'
5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCT-3'			β -Actin
5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'			β -Actin

^aF, forward; R, reverse.

^bGenebank accession No. of either NR1 duck cDNA (D83352) or rat genomic sequence (L08228).

^cChick NR1 genomic sequence (Zarain-Herzberg et al., manuscript in preparation).

β -actin amplification. PCRs were carried out using Taq polymerase (Invitrogen Co.) as follows: 2.5 U Taq, 0.4 μ M each primer, 0.5 mM each dNTP, 1.66 mM MgCl₂, and the manufacturer's recommended buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl). A thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA) was used for amplification. The samples were subjected to 27 cycles of the protocol 94°C, 30 sec; 56°C, 30 sec (54°C for exon 5 samples); 72°C, 45 sec; and a final elongation step of 72°C, 10 min. The number of cycles was determined according to the expression of the target gene. At 27 cycles, we obtained the optimal amplification without losing the linear range that guarantees a proportional relationship between input RNA and densitometric readout. As a positive control, a plasmid with duck NR1 was used (a gift of Dr. N. Kimura). The products were resolved in 1.5–2% agarose gels, stained with ethidium bromide, and visualized. Densitometric analysis was performed with the Kodak 1D version 3.5 image package. Each RT-PCR was repeated at least three times, and representative results are shown.

Statistical Analysis

PCR results were analyzed as follows. Digitalized images of target (NR1) and control (actin) products were imported into the Kodak 1D version 3.5 image package, and the average intensity of each band was measured (in pixels) and normalized to the corresponding actin band to obtain a ratio of target product to actin for each sample. Each of the resulting corrected ratios was log transformed (multiplied by 100) so that numbers, when analyzed for statistical significance, would be of appropriate order. Statistical significance was calculated using a one-way analysis of variance.

Sequence Analysis of RT-PCR Products

PCR products were demonstrated to code for NR1, by purifying the resulting bands from gel slices using the Gene Clean III kit (Bio 101 Inc., La Jolla, CA) and sequencing the DNA fragments in an automated ABI Prism 310 Genetic Ana-

lyzer (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Norwalk, CT). The resulting sequences were used in a BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Sequence matches with expectation (E) values <1 were considered significant. In all cases, the amplified products returned NMDA receptor sequences as the top results of the search.

Multiple alignments were performed using BCM Search Launcher's Clustal W program (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>). Translation of the sequences was performed using the JustBio translation tool (<http://www.justbio.com>), and protein sequence analysis was performed by the PROSITE ExPASy molecular biology server (<http://ca.expasy.org/cgi-bin/scanprosite>).

Western Blot of NMDAR1 Isoforms

Retinas from E13, E17, and PH3 chicks were dissected and primary subcellular fractions obtained as previously described (López-Colomé and Lee, 1996). Briefly, retinas were homogenized in 0.3 M sucrose containing 10⁻⁴ M MgSO₄. The crude nuclear fraction containing the synaptic endings of photoreceptors and the crude synaptosomal fraction containing the nerve endings of the IPL were osmotically disrupted, and membranes were obtained by centrifugation at 45,000g for 20 min at 4°C, washed twice with Tris-HCl buffer 0.05 M, pH 7, and frozen for 48 hr. Protein content of the samples was determined according to Bradford (1976).

Fifty micrograms of protein were dissolved in Laemmli buffer (Laemmli, 1970) and loaded onto 7.5% polyacrylamide gels, separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to PVDF membranes (Hybond-P; Amersham). Nonspecific antibody binding was blocked with nonfat milk powder 5% in Tris-buffered saline (TBS) for 1 hr. Membranes were incubated with the primary antibodies (Novus Biologicals, Littleton, CO) overnight at 4°C, washed three times with TTBS (Tween-20 0.05% in TBS), and incubated for 2 hr with anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP; Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) antibody in

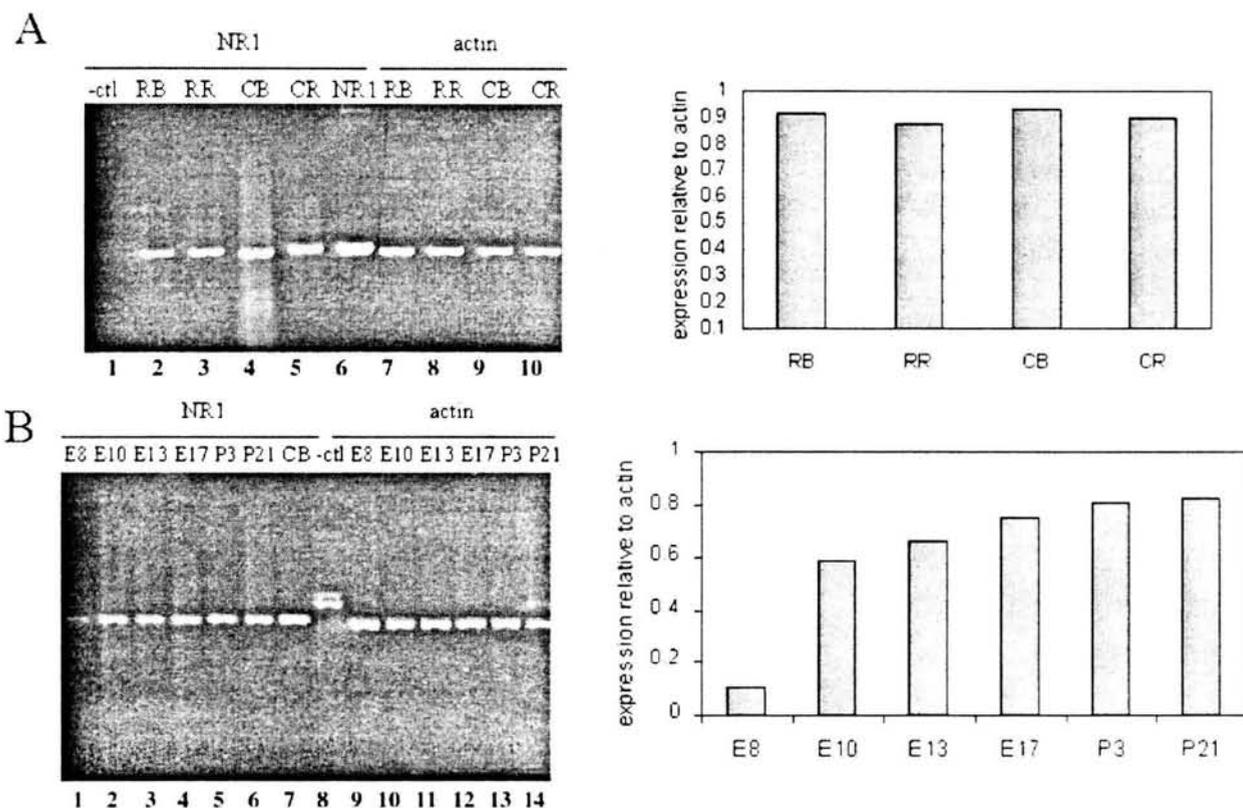


Fig. 1. Expression of NMDAR1 in mature and embryonic retina. NR1 variant expression was determined by RT-PCR using a set of primers that amplifies a common region of all NMDAR1 isoforms as described in Materials and Methods and Table I, in mature (**A**) and embryonic (**B**) retina. The charts at right correspond to the densitometric analyses of the gels shown at left. Actin mRNA was amplified as expression control. Results are representative of at least three independent experiments. **A**: NR1 mRNA expression in PH3 chick retina and brain (lanes 4, 5, 9, 10) was compared with that of rat (lanes 2, 3, 7, 8),

which has been previously characterized (Kreutz et al., 1998). Lanes 7–10 correspond to amplification with actin. RB, rat brain; RR, rat retina; CB, chick brain; CR, chick retina; NR1, 15 ng duck NR1; -Ctl, negative control (no reverse transcriptase added). **B**: Developmental expression of NR1 transcripts in the chick retina. NR1 expression was monitored at E8, E10, E13, and E17, and posthatching days (PH) 3 and 21 (lanes 1–6). CB, chick brain; -Ctl, negative control. Lanes 9–14, actin PCR product.

TTBS. After three washes with TTBS, antibody binding was visualized with diaminobenzidine (Sigma, St. Louis, MO).

RESULTS

NR1 Expression in the Chick Retina

To analyze the expression of NR1 isoforms, the mRNA samples from chick retina were compared with those from rat retina. For this purpose, PCR primer pairs were designed based on the known sequence of a duck NMDAR1 cDNA (Kurosawa et al., 1994; Genebank accession No. D83352) and for the rat NMDAR1 cDNA and the exonic genomic sequences (Hollmann et al., 1993; Genebank accession No. L08228) shown in Table I. RT-PCR amplification using a set of primers complementary to exons 8–10, which recognize all NR1 isoforms, showed no significant difference between the expression of NMDAR1 in the brain cortex and the retina (Fig. 1A). NR1 expression was analyzed in chick embryo retinas at

developmental days E8, E10, E13, and E17 as well as in retinas from 3- and 21-day-old chicks (PH3, PH21). Starting at E8, a steady increase in NR1 expression with developmental stage was observed, reaching a maximal level at E17 (Fig. 1B).

Expression of NR1 Isoforms Containing the Amino-Terminal Cassette N1

To analyze the expression of NR1 isoforms containing exon 5, which encodes for the alternatively spliced cassette N1, a set of PCR primers that anneal to exon 4 and exon 6 was designed, flanking the region to be spliced in or out. These primers generated a fragment of 263 bp containing exon 5 and a fragment of 200 bp lacking the exon. Our results show that exon 5-lacking NR1 isoforms prevail in early embryonic retina (E8), whereas, at later developmental stages, an increase in exon 5-containing isoforms expression is observed up to mature retina (Fig.

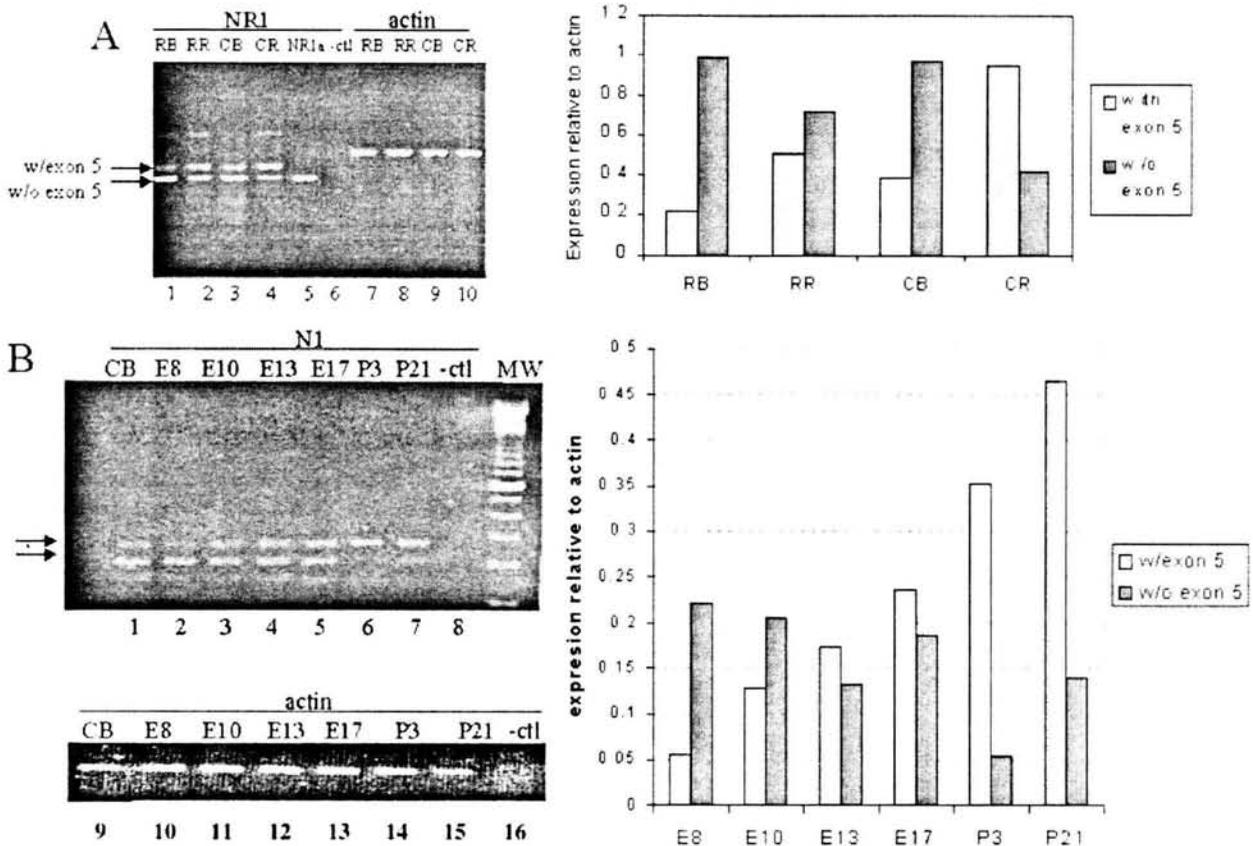


Fig. 2. Expression of NMDAR1 isoforms containing the N1 cassette. RT-PCR products of NR1 using primers amplifying the region between exons 4 and 6 in mature (A) and embryonic (B) retina. Results are representative of at least three independent experiments. A: Chick NR1 samples (lanes 3, 4, 9, 10) were compared with rat NR1 samples (lanes 1, 2, 7, 8). Details are as described for Figure 1. Lanes 7–10, actin expression. RB, rat brain; RR, rat retina; CB, chick brain; CR, chick

retina; NR1, 15 ng duck NR1 lacking exon 5; -Ctl, negative control. B: Developmental expression of exon 5 containing NR1 mRNA transcripts in the chick retina. Exon 5-containing NR1 expression (lanes 1–8) was analyzed at E8, E10, E13, E17, PH3, and PH21. -Ctl, negative control. Lane 1, Invitrogen 100-bp DNA ladder; lanes 9–16, actin samples.

2B). Thus, posthatch chick retina (PH3) expresses mainly exon 5-containing NR1 isoforms, in contrast to the brain cortex, in which exon 5-lacking isoforms predominate. Although this difference in tissue-specific expression is observed in both rat and chick, it is more pronounced in chick (Fig. 2A).

Expression of NR1 Isoforms Containing the Carboxyl-Terminal Cassette C1

The expression of NR1 isoforms containing exon 21 (C1 cassette) in chick retina was analyzed using PCR primers that anneal to exon 19 and exon 21. No significant difference in the level of expression between retina and brain was observed (Fig. 3A). In parallel with the general expression of NR1, exon 21-containing isoforms increase with development, reaching a maximal level at E17 (Fig. 3B). However, whereas the expression of C1-containing transcripts declines posthatching, the total expression of NR1 and of exon 5-containing isoforms is maintained

following E17, which indicates an increase in receptors lacking exon 21 toward the final stages of development.

Expression of NR1 Isoforms Containing the Carboxyl-Terminal Cassettes C2 and C3

To determine the relative expression of NR1 variants containing the cassettes C1 and C2, a set of PCR primers was designed to amplify the region spanning from exon 20 to exon 22 (primer pairs 2868F and 3390R; Table I). Amplification from chick brain mRNA samples generated a single PCR product of 550 bp, shown to correspond to NR1 isoforms containing both exon 21 (cassette C1) and exon 22 (cassette C2) by DNA sequencing. Up to the end of the sequence of exon 21, this fragment is 94% homologous to the duck NR1 cDNA sequence and shows 84% homology to the rat NR1 cDNA sequence (see Fig. 5A). Downstream from exon 21, the chick 550-bp NR1 fragment is 96% homologous to the duck sequence but differs significantly from the sequence of exon 22 in the rat

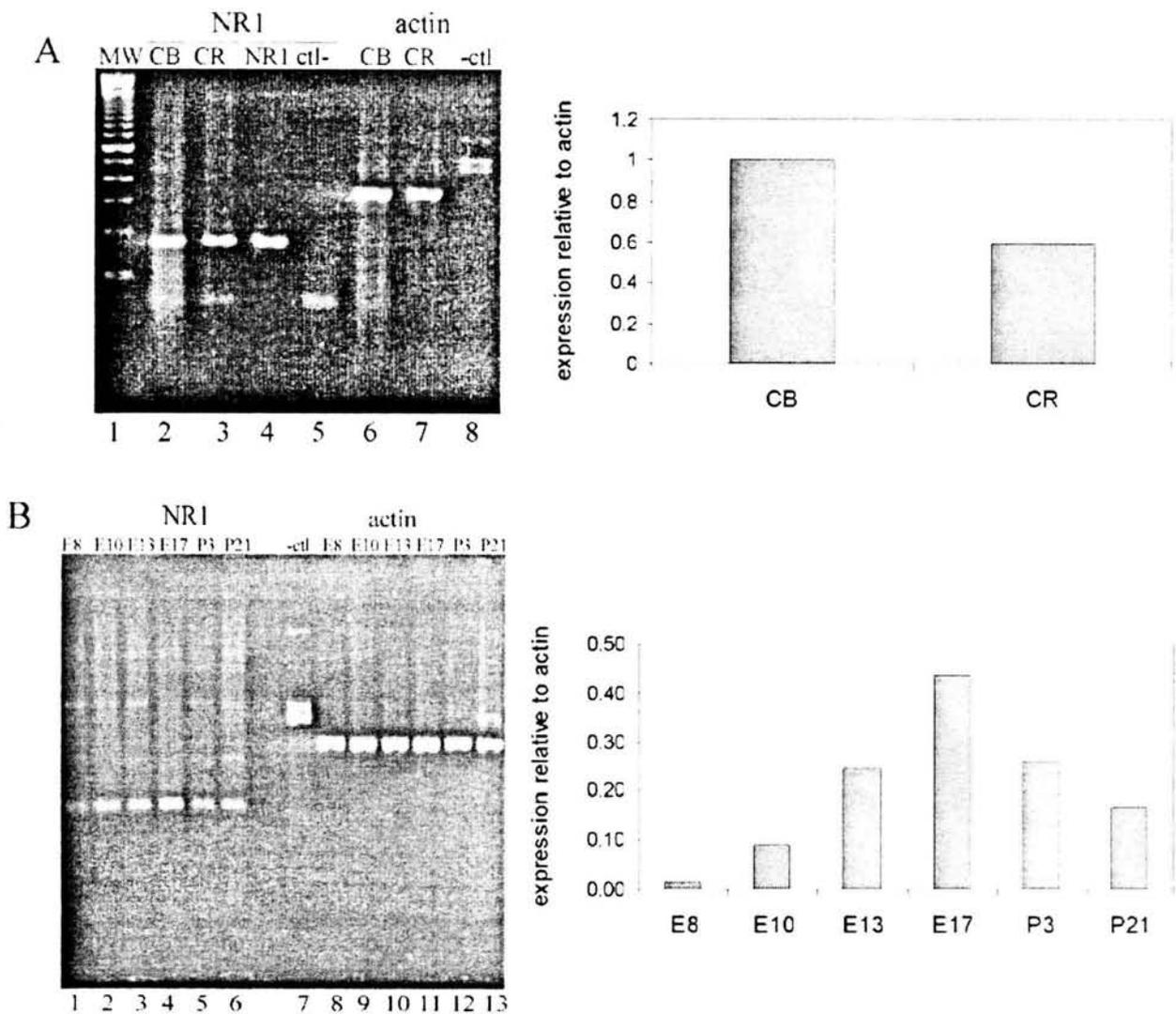


Fig. 3. Expression of NMDAR1 isoforms containing C1 cassette. RT-PCR products of NR1 using primers amplifying the region between exons 19 and 21 in mature (A) and embryonic (B) retina. Results are representative of at least three independent experiments. A: Chick brain (lane 2) and chick retina (lane 3) mRNA samples were compared. Lanes 6 and 7, actin mRNA expression in chick brain and retina, respectively. -Ctl, negative control; NR1, 15 ng duck NR1 (contain-

ing exon 21); lane 1, molecular weight markers as in Figure 2. B: Developmental expression of cassette C1 containing NR1 transcripts in the chick retina. Exon 21-containing NR1 expression was analyzed at E8, E10, E13, E17, PH3, and PH21 (lanes 1–6, respectively) and compared with actin mRNA expression at the same ages (lanes 8–13). Details as for Figure 1.

gene (Hollmann et al., 1993; Kurosawa et al., 1994; see Fig. 6A).

In addition to the 550-bp DNA fragment, two DNA products of 480 bp and 440 bp were amplified in retina mRNA samples (Fig. 4A). Sequence analysis of these bands revealed that the 440-bp DNA fragment corresponds to NR1 isoforms lacking exon 21 (cassette C1). Importantly, we have demonstrated that the 480-bp fragment lacks exon 21 and contains a novel 41-bp DNA insertion with no significant homology either to exon 21 or to any other reported sequence (see Fig. 6), encoding

for an extra six amino acids in frame with the sequence of the preceding exon 20, followed by a termination codon (see Fig. 6B). This DNA fragment corresponds to NR1 isoforms containing a novel exon present in the chick NR1 gene and that encodes for a new splicing cassette, here named C3, which had not been identified previously (Zarain-Herzberg et al., manuscript in preparation).

To discard an experimental artifact, a different set of primers for PCR amplification was designed (primers 3016F and 3197R; Table I), which generated this same novel fragment, as confirmed by sequencing (data not

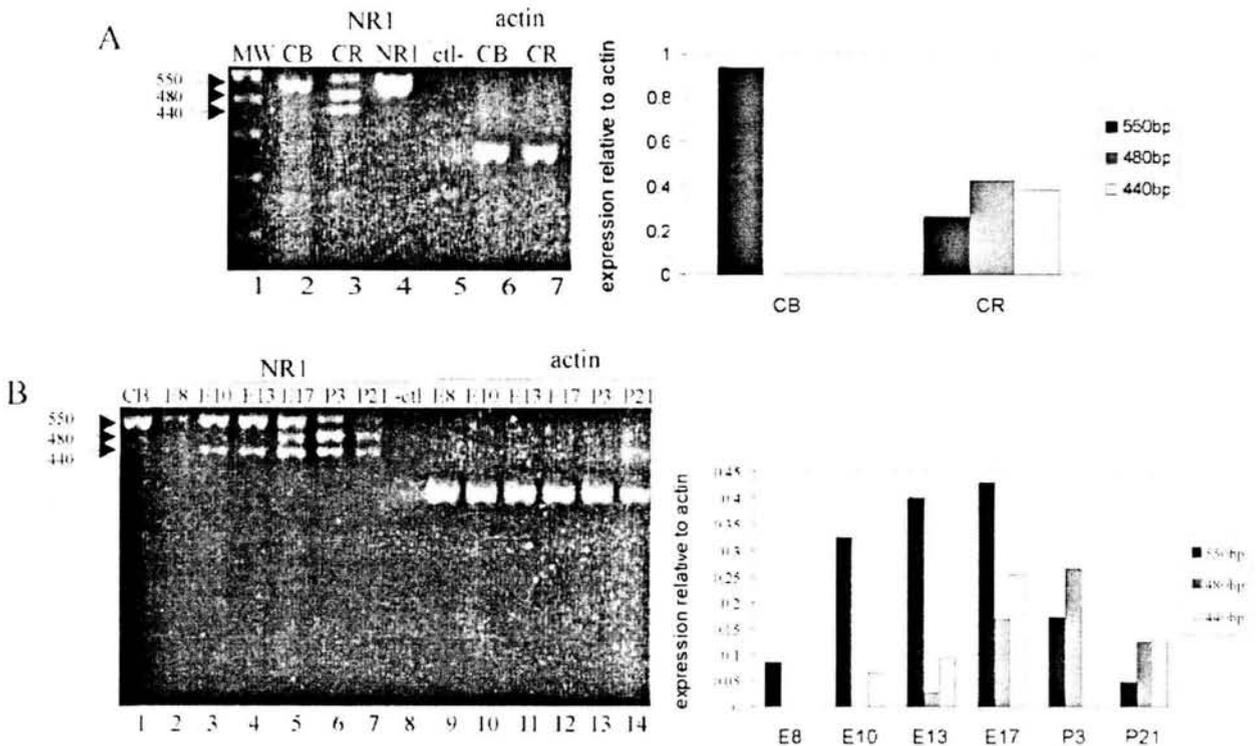


Fig. 4. Expression of NR1 transcripts containing cassettes C2 and C3. Specific primers amplifying the regions between exons 19 (2868F) and 22 (3390R) of NR1 were used for RT-PCR of mature (A) and embryonic (B) retina as described in Materials and Methods. Details as for Figure 1. Representative results for at least three independent experiments are shown. CB, chick brain; CR, chick retina; NR1, 150 ng duck NR1; -Ctl, negative control; MW, molecular weight markers. A: mRNA samples from chick brain (lanes 2, 6) and chick retina (lanes 3, 7) were compared. Lanes 2–5, amplification with NR1 C-terminal

primers (see Materials and Methods). Lanes 6 and 7, actin amplification. Three bands of 550 bp, 480 bp, and 440 bp are amplified in the retina. B: Developmental expression of C-terminal variants NR1 in the chick retina. C-terminal variants expression were analyzed at E8, E10, E13, E17, PH3, and PH21 (lanes 1–6, respectively) and compared with actin mRNA expression at the same ages (lanes 8–13). Details as for Figure 1. NR1 isoforms containing exon 21 predominate during early stages of development. As maturation proceeds, expression of isoforms lacking exon 21 and containing C3 increases.

shown). Nucleic acid secondary structure was discarded as the source of the 480-bp fragment by performing the RT reaction, PCR, or both, in the presence of betaine and dimethyl sulfoxide (DMSO), agents known to disrupt secondary structure interactions (Bookstein et al., 1990; Hung et al., 1990). Also for this purpose, the RT reaction temperature was increased to 65°C, and the concentrations of KCl and MgCl₂ were varied in both RT and PCR. None of these changes modified either the proportion or the sequence of the observed bands (data not shown). The 3' sequence of chick brain and retina RNA samples showed high homology (96%) to the duck NR1, and no homology to mammalian NR1, which also rules out an experimental artifact (see Fig. 6A).

The expression of splice variants containing the C1 and C2 cassettes in early development (E8) is similar in chick retina and brain, the predominant isoform shown to contain exon 21 (cassette C1). The NR1 isoform lacking exon 21 is first expressed at E10, peaks

at E17, and reduces its expression after hatching, whereas the isoform containing the novel cassette C3 is first detected at E13, peaks at PH3, and declines in the mature retina (PH21).

Expression of NR1 Isoforms Containing the Carboxyl-Terminal Cassettes C2' and C3

To confirm further the existence of splice variants containing the novel C3 cassette, as well as to assess the presence of isoforms containing the cassette C2', PCR primer pairs from the DNA sequence corresponding to exon 22 of the chick NR1 gene were designed (Zarain-Herzberg et al., manuscript in preparation). RT-PCR amplification using a set of primers covering the exon 20 to exon 22 region (3016F and C2'R; Table 1) demonstrates only one band in the brain (925 bp), two bands in the cerebellum (925 and 860 bp), and three bands in the retina (925, 860, and 820 bp). The 925-bp DNA product corresponds to isoforms containing cassette C1 and C2'; the 860-bp DNA product corre-

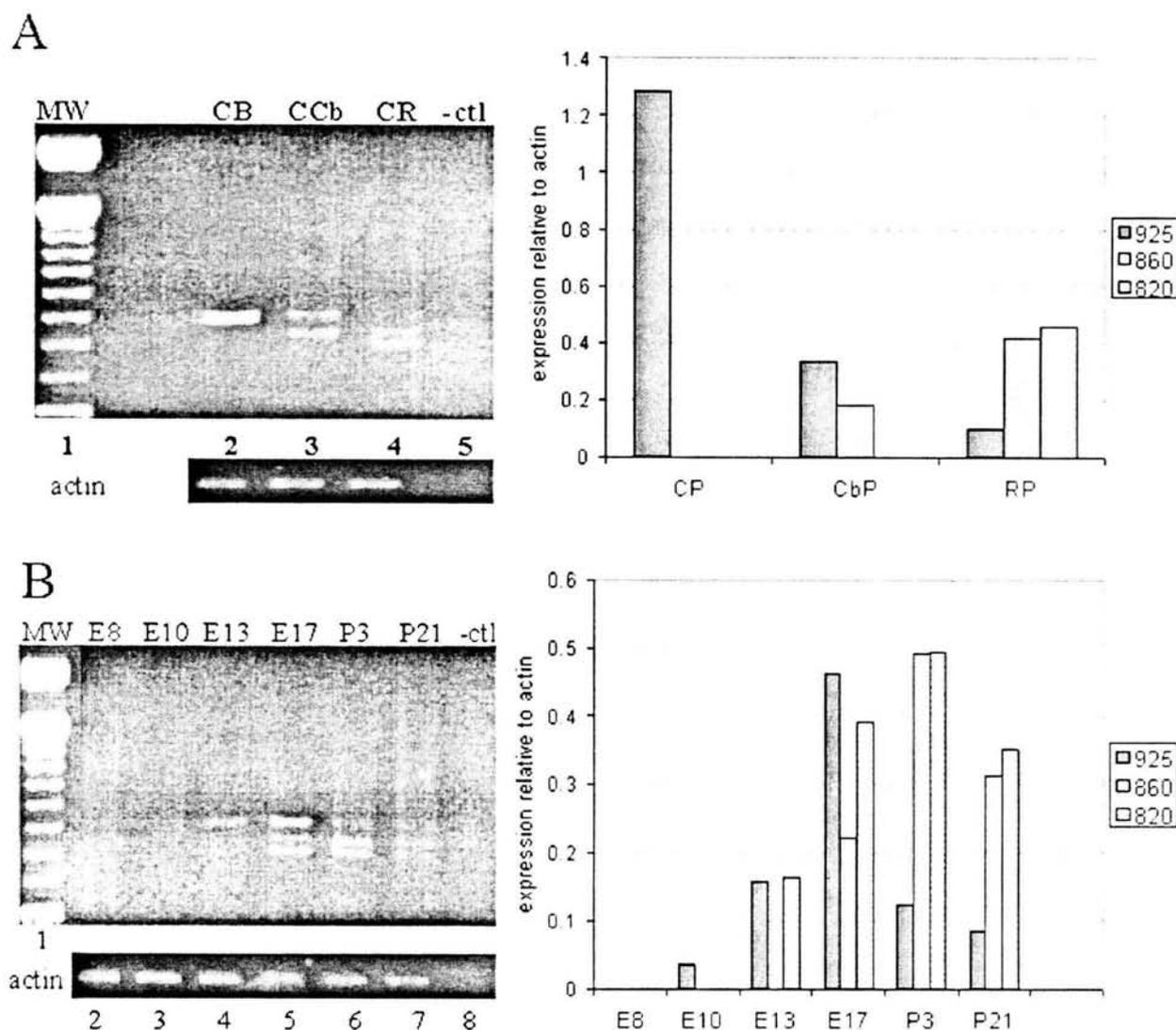


Fig. 5. Expression of NR1 transcripts containing cassettes C2' and C3. Specific primers amplifying the regions between exons 19 (3016F) and 22 (C2'R) of NR1 were used for RT-PCR of mature (A) and embryonic (B) retina as described in Materials and Methods. Details as for Figure 1. Representative results for at least three independent experiments are shown. CB, chick brain; CCb, chick cerebellum; CR, chick retina; -Ctl, negative control; MW, molecular weight markers (Invitrogen 100-bp ladder). A: mRNA samples from chick brain (lane

2), chick cerebellum (lanes 3), and chick retina (lane 4) were compared. Actin amplification is shown in the lower panel. Densitometric analysis is shown at right. Three bands of 925 bp, 860 bp, and 820 bp are amplified in the retina. B: Developmental expression of C2'-containing NR1 variants in the chick retina. Expression was analyzed at E8, E10, E13, E17, PH3, and PH21 (lanes 2-8) and compared with actin mRNA expression at the same ages (lower panel). Densitometric analysis is shown at right. Details as for Figure 1.

spends to isoforms containing the C3 and C2' cassettes; and the 820-bp product lacks cassette C1 and C3 and contains only the cassette C2' (Fig. 5A). Developmental expression patterns of NR1 isoforms containing C2' cassette are very similar to those of isoforms containing C2 cassette, although these appear later, at E10 (Fig. 5B). Figure 6E shows a schematic representation of the pattern of splicing that generates the variants at the carboxy-terminal region of NR1.

Protein Expression of NR1 Isoforms Containing Cassettes N1 and C1

NR1 protein expression was determined by Western blot using specific antibodies directed to N1 amino-terminal cassette or to C1 carboxy-terminal cassette. Synaptosomal proteins of the IPL and outer plexiform layer (OPL) of retinas of E13, E17, and PH3 were analyzed. These stages were selected because synaptic

connections in the retina are first established during this period (Mey and Thanos, 2000). Results showed NR1 expression to predominate in IPL over OPL, in agreement with findings in the rat retina (Gründer et al., 2000). Figure 7 shows that NR1 protein expression increases with tissue maturation, in keeping with our results obtained by amplification of NR1 mRNA using RT-PCR (Fig. 1).

DISCUSSION

The present study examines the expression of NR1 splice-generated isoforms in the chick retina and shows the presence in this tissue of NR1 splice variants distinct from those previously described for the CNS, which are differentially expressed throughout embryonic development. We demonstrate the presence in the retina of a novel NR1 isoform (named here C3), not identified previously within the nervous system. We show that, in early developmental stages, NR1 mRNA expression in the retina parallels its CNS counterpart, consisting of isoforms that lack exon 5 and contain exon 21. During retinal differentiation, NR1 splice variants that include exons 5 and 21 as well as C-terminal variants containing the C2 or the C3 cassettes are expressed.

NR1 Expression in Mature Retina

N-terminal splice variants. Our data suggest that the distinct pharmacological properties displayed by NMDARs in mature retina regarding the effect of antagonists and spermine could be related to the prevalence of NR1 isoforms containing exon 5 in this tissue, in contrast to the CNS. The inclusion of exon 5-containing NR1 has been shown to lower the affinity of NMDARs for agonists and to increase the affinity for competitive antagonists, such as 2-amino-5-phosphonovalerate (APV) and 3-[(+)-2-carboxypiperazin-4-yl]-propyl-1-phosphonic acid (CPP; Hollmann et al., 1993), for the NMDA receptor channel blocker 5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohept-5,10-imine maleate [MK-801(+)], as well as for 7-chlorokynurenic acid (7CK), a competitive antagonist at the glycine coagonist site (Durand et al., 1993; Hollmann et al., 1993). In agreement with the presence of exon 5 (cassette N1)-containing variants, NMDARs in the mature retina differ pharmacologically from those in the CNS regarding CPP and MK-801(+) binding (López-Colomé and Somohano, 1992; Boje et al., 1992). Also along this line, glycine binding to the coagonist site in retinal membranes is not significantly modified by 7CK or the specific antagonist 5-nitro-6,7-dichloro-1,4-dihydroquinoxaline-2,3-dione (ACEA-1021; Rodríguez-Contreras et al., 1998), which could explain the lack of effect of 7CK in protecting retinal neurons from ischemic damage, as opposed to its action in the brain (Lombardi and Moroni, 1994). However, because MK-801 and CPP binding sites involve a complex interaction among NR1 and NR2 subunits, the properties displayed by these antagonists in the retina could additionally relate to the particular NR2 included in heteromers (Lombardi and Moroni, 1994; Buller et al., 1994; Kashiwagi et al., 2002).

The presence of exon 5-containing NR1 in mature retina (Fig. 2), could also contribute to explain the contrasting effect of polyamines (PA) in the retina compared with the brain (Benveniste and Mayer, 1993); whereas, in the brain, PAs stimulate NMDA responses because of an increase in glycine affinity for the coagonist site, spermine inhibits strychnine-insensitive glycine binding in the retina (Calderón and López-Colomé, 1998), in agreement with data showing that NMDARs that include the exon 5-containing NR1 subunit are not potentiated by spermine (Durand et al., 1992). PA stimulation of NMDA responses also depends on the NR2 subunits associated with NR1, NR1a/NR2C receptors showing neither glycine-dependent stimulation nor potentiation by spermine (Williams, 1995). Together with this evidence, our results suggest that NMDARs in the retina might include exon 5-containing NR1 (present results) and NR2C, predominantly expressed in the cerebellum and the retina (Brandstätter et al., 1994; Cristóvão et al., 2002).

C-terminal splice variants. Our results demonstrate that the mature chick retina, as shown previously in rat retina (Kreutz et al., 1998), expresses mainly NR1 isoforms lacking exon 21 (Fig. 4A), as well as isoforms containing either exon 21, or the novel cassette C3, and an unusually large C-terminal region highly homologous to the rat NR1 up to the end of exon 21 (Kurosawa et al., 1994). The C-terminal region of NMDAR subunits varies widely among species (Bottai et al., 1998). The C1 cassette of the rat NR1 carries neurofilament interaction sites (Ehlers et al., 1998) and has been shown to participate in the surface expression and targeting of NR1 to surface-associated clusters (Okabe et al., 1999). Phosphorylation sites for protein kinase A (PKA) and PKC are also contained in this region (Tingley et al., 1993, 1997). In the chick, the C1 cassette shows 99% homology to the reported duck sequence (Kurosawa et al., 1994) and possesses PKC phosphorylation sites, an ER retention signal (Fig. 6C), and a high-affinity calmodulin (CaM) binding site that modulates the inactivation of NMDARs (Ehlers et al., 1996).

We demonstrated that the C-terminal region of chick NR1 does not contain PDZ-binding domains or a PSD95 anchoring sequence in the C2, C2', or C3 cassette, in contrast to mammalian C2' cassette (Kornau et al., 1995; Standley et al., 2000). Interestingly, the C2 cassette contains two putative PKC phosphorylation sites and an N-myristoylation site (Fig. 6C), which could mediate receptor localization in the membrane, since it is devoid of PDZ-interacting domains. The significant differences in the C-terminal region of chick retinal NR1 compared with mammalian receptors (Durand et al., 1993; Ehlers et al., 1996; Okabe et al., 1999) strongly suggest that membrane targeting and synaptic expression of NMDARs are regulated by different mechanisms in avian species.

The novel retinal NR1 isoform containing the C-terminal cassette C3 would include six amino acids (EETSEH) following the C0 cassette (C-terminal portion

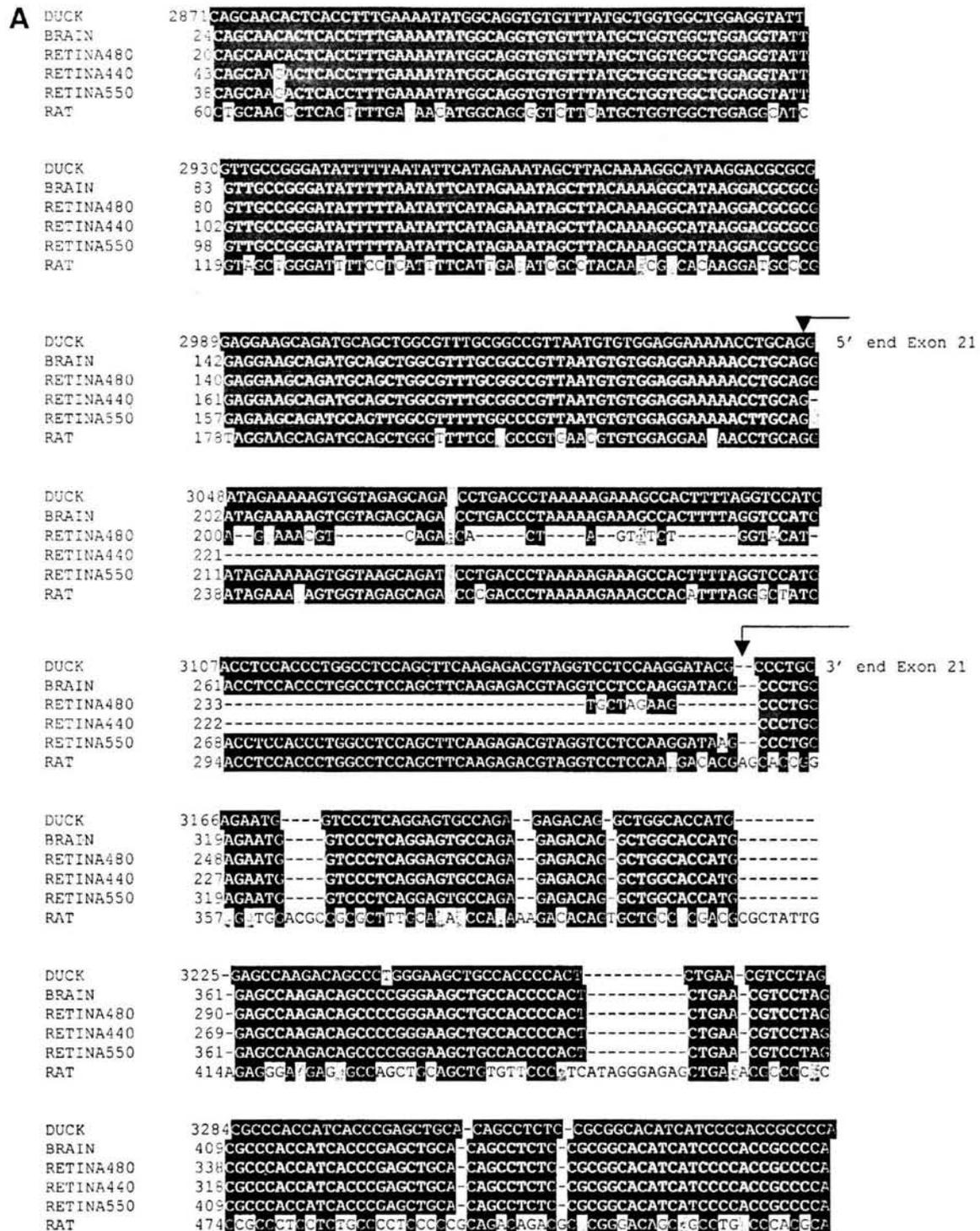


Fig. 6. Sequence analysis of the chick NR1 carboxyl-terminal isoforms. **A:** Alignment of the sequence of chick NR1 RT-PCR products shown in Figure 4 with the previously reported duck NR1 cDNA (D83352) and rat NR1 genomic sequence (L08228). High-homology regions are shown in black. Arrows indicate the beginning and the end of the region corresponding to exon 21. **B:** Translation of the 480 bp RT-PCR retina fragment. The novel C3 cassette translated sequence is highlighted in gray. The stop codon is shown in boldface letters. **C:** Translation of retinal 550-bp fragment. Exon 21 region is high-

lighted in gray. PKC phosphorylation sites (Tingley, et. al. 1997) are shown in white cases as well as the ER retention signal (boldface in white cases). N-myristoylation site present in C2 is underlined, and the putative PKC phosphorylation sites and the stop codon are shown in boldface. **D:** Translation of C2' cassette. Two putative PKC phosphorylation sites are shown in boldface. **E:** Schematic representation of chick NR1 C-terminal splice variants. Gene structure of the 3' section of NR1 chick gene is shown in the upper panel, splice variants that we have observed in Figures 4 and 5 are represented in the lower panel.

B

```

1 - CAGGGGTTTTTATATTCATAGAAATACCTTACAAAAAGGCATAAGGACCGCGGGAGGAAAG - 65
  - Q G V F I F I E I A Y K P H M D A R R K
61 - CAGATGPAAGCTGGCGTTTGGCGCGTTAATGTGTGGAGGAAAAAAGCTGCAGGAGGAAACG - 120
  - L M Q L A F A A V N V W R K N L Q E E T
121 - TCAGAGCAGCTAGTATCTCGTACATTGCTAGAAAGCCCTGCAGAATGGTCCCTCAGGAGTGC - 180
  - S E H *
181 - CAGAGAGACAGGCTGCTCCATGGAGCCAAAGACAGCCCGGGGAAGCTGCCACCCACTCTG - 240
  -
241 - AACGTCCAGCCCATCATCACCCGAGCTGGACAGCCCTCTCCGCGGCACATCATCCCCACC - 300
  -
301 - GCCCCAGGAGAGATCATGTGTTCGCCATAGCACTCCTGCAACTGGAATAGCACTCCGAG - 360
  -
361 - AGGTGAGGTACTGCTTCATTCGA - 383
  .

```

C

```

1 - GATTCCCGTAGCAATGCCCCAGCAACTCAGCTTTGAAAATATGCCAGGTGTCTTTATG - 60
  - D S R S N A P A T L T F E N M A G V F M
61 - CTGGTGGCTGGAGGTATGTTCGCCGGATATTTTAAATATTCATAGAAATAGCTTACAAA - 120
  - L V A G G I V A G I F L I F I E I A Y K
121 - AAGCATAAGGAGCGCCCGGAGGAASCAGATCCAGCTGCGCTTTGCGCGCTTAAATGTGTGG - 180
  - R H F D A R R K Q M Q L A F A A V N V W
181 - AGCAAAAAAGCTGAGGATAGAAAAAGTGGTAGAGCAGAACCCTGACCCCTAAAAAGAAAGCC - 240
  - R F N L Q D R K S G R A E P D P K K K A
241 - ACTTTTAGGTCCATCACCTCCACCCTGGCCTCCAGCTTCAAGAGACGTAGGTCCCTCCAAG - 300
  - T F R S I T S T L A S S F K R R R S S K
301 - GATACGCCCTGCACAATGGTCCCTCAGGAGTGCCAGAGAGACAGGCTGGCACCATGGAGC - 360
  - D T P C R M V P Q E C Q R D R L A P W S
361 - CAAGACAGCCCCGGGAAGCTGCCACCCCACTCTGAACCTCCTAGCCCCACCATCACCCG - 420
  - Q D S P G K L P P H S E R P S A H H H P
421 - AGCTGCACAGCCTCTCCGCGGCACATCATCCCCACCCGCCCGAGGAGAGATGCATGTGTT - 480
  - S C T A S P R H I I P T A P G G D A C V
481 - CCCCATAGGCAGCTCCTGCAACTGGAATAGCACTCCGAGAG - 521
  . P H R Q L L Q L E .

```

D

MEYVHGKGLHFSERSATPKPSAFWLKLDLAFGPEQPSVGRQRVFFKGLTFSTARLRLAGILIFN

Figure 6. (Continued.)

following TM4 and preceding C1 cassette) encoded by a 41-bp exon that has not been found in the rat gene (Fig. 6), and shows no significant homology to other reported sequences in nucleotide databases. It is important to mention that BLAST analysis of the novel exon C3 with the rat NR1 genomic sequence covering from exon 20 to exon 22 and containing introns 20 and 21 (Gene bank accession No. AY090615) with mouse NR1 genomic sequence (Gene bank accession No. AL732309) and with the human NR1 gene (Gene bank accession No. Z32774) did not reveal any homology, indicating that the novel exon C3 present in the chick NR1 gene (Zarain-Herzberg

et al., manuscript in preparation) does not have an equivalent in the NR1 genes of mammals.

The deduced amino acid sequence contains a consensus sequence for casein kinase II (CKII) phosphorylation (Meggio et al., 1994; Kuenzel et al., 1987; Fig. 6B). Although the physiologic significance of this site is still unknown, a role for CKII in the maintenance of the basal activity of the NMDAR channel in the hippocampus (Lieberman and Mody, 1999) as well as in the regulation of circadian rhythms has been proposed, and avian retina is clearly involved in this process (Whitmore et al., 2000).

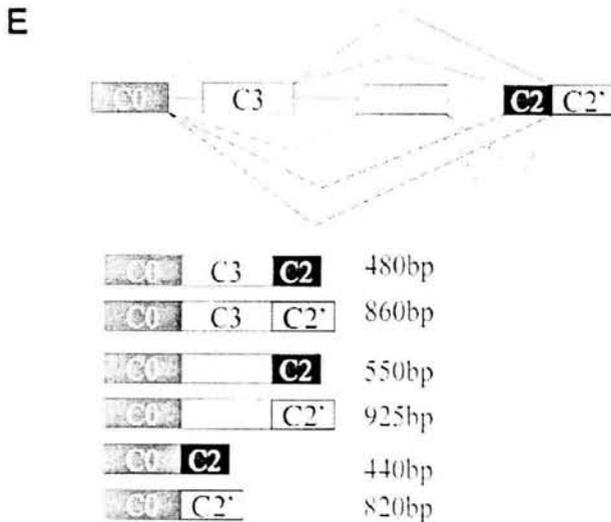


Figure 6. (Continued.)

Developmental Expression of NR1

In addition to its neurotransmitter role, glutamate also functions as a trophic factor in development, related to cell division, differentiation (Michaelis, 1998), and developmentally regulated apoptosis, which plays a major role in the shaping of retinal circuitry (Ientile et al., 2001). Furthermore, calcium increase through NMDA receptors is known to trigger the release of nitric oxide, a retrograde messenger involved in the refinement of synaptic connections in the brain (Cogen and Cohen-Cory, 2000) and the retina (Anand et al., 1985; López-Colomé, submitted for publication).

Retinal NMDAR expression in development has been studied in different animal models (Watanabe et al., 1994; Gründer et al., 2000), including the chick (Somohano et al., 1988; Bredariol and Hamasaki-Britto, 2001), although the alternative splicing of the NR1 subunit has not been addressed. NR1 is first expressed at E8 (Fig. 1), coincident with the switch from proliferation to differentiation in the retina (Mey and Thanos, 2000). The main isoforms expressed lack exon 5 (cassette N1) and include exon 21 (cassette C1) and/or exon 22 (cassette C2). This pattern of expression changes during differentiation, to isoforms containing N1, C2, and C2' cassettes and mainly lacking cassette C1, which prevails in the mature retina (Boje et al., 1992; present work). This developmental variation possibly underlies an increasing control of intracellular calcium concentration, a general phenomenon observed in the nervous system, which accompanies the enhancement of synaptic efficacy (Nakanishi and Masu, 1994).

In the mammalian retina, dendritic remodeling, priming, and segregation into functional laminae, which are accomplished between E6 and E16 (Mey and Thanos, 2000), involve NMDAR activation (Goodman and Shatz, 1993). In the chick retina, the appearance of receptor

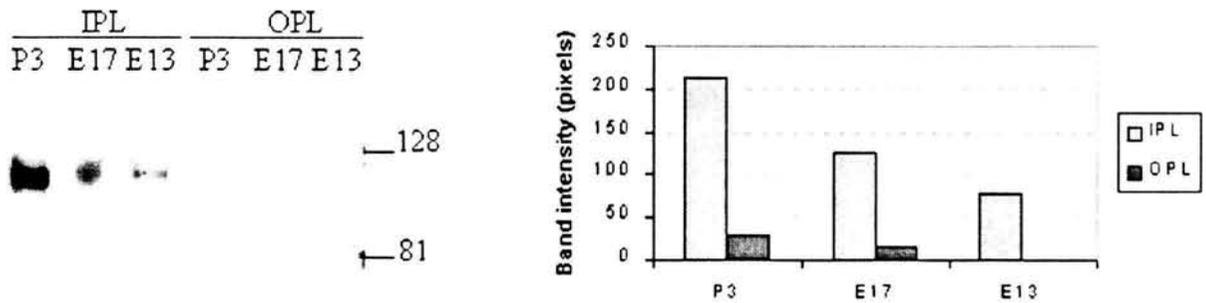
potentials (Hanawa et al., 1976) and the establishment of synapses at the IPL (Mey and Thanos, 2000) occur in parallel to NMDA-evoked intracellular calcium increases (Sugioka et al., 1998). Along these lines, an increase in $^3\text{H-NMDA}$ binding from E14 to mature levels at E18 (Somohano et al., 1998), together with a fourfold increase in the displacing efficiency of competitive NMDA antagonists, has also been shown (López-Colomé and Somohano, 1989). We have demonstrated here that mRNA expression of N1-containing NR1 increases progressively in the retina, reaching its maximal level at E17, which persists in the adult (Fig. 2B). Protein levels also increase progressively from E13 to PH3 (Fig. 7A). NMDA receptors containing the N1 cassette (exon 5) exhibit reduced cation permeability and agonist potency and are still functional at more acidic pH, because of low sensitivity to proton inhibition. These features together with the appearance of calcium-binding proteins during the last week of embryonic development (Ellis et al., 1991), may be important for controlling Ca^{2+} entry into retinal neurons induced by the tonic release of glutamate in this tissue (Nakanishi et al., 1998).

During the stratification of the retina, the structural arrangement of receptors and signal-transducing molecules is important for establishing refined synaptic connectivity. The C1 cassette of NR1 is involved in receptor clustering, interaction with neurofilaments, and PKC potentiation; we found that mRNA expression of cassette C1-containing NR1 peaks at E17 (Fig. 3B), the stage in which stratification in the retina is completed and synapses of bipolar cells with photoreceptors allow the first electrical responses to light, which implies transduction through glutamate receptors (Mey and Thanos, 2000). In contrast with mRNA expression (Figs. 3–5), protein expression of isoforms containing this cassette was steadily increased in synaptic membranes up to PH3. Such a difference possibly relates to changes in the rate of mRNA translation or to maturation-dependent enhancement of protein membrane expression.

Membrane-retention PDZ domains have been found to play an essential role in the interaction of NMDAR subunits with postsynaptic density proteins. It is noteworthy that no PDZ-interaction domains were identified in chick NR1 at the developmental ages studied, in agreement with the reported duck sequence (Kurosawa et al., 1994). Hence, the regulation of surface expression and synaptic location of NMDARs in the chick retina must involve additional domains, and possibly intersubunit interactions, which await clarification. The developmental variation of NR1 isoforms with distinct C-terminus, however, suggests that this region plays an important role in the physiological regulation of the receptor.

The refinement of synaptic connectivity in the retina from E13 to PH3 is a complex phenomenon involving the light-independent generation of activity waves as well as naturally occurring cell death in the visual system. Intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ increase mediated by NMDARs and non-NMDARs has been shown to participate in both processes

A



B

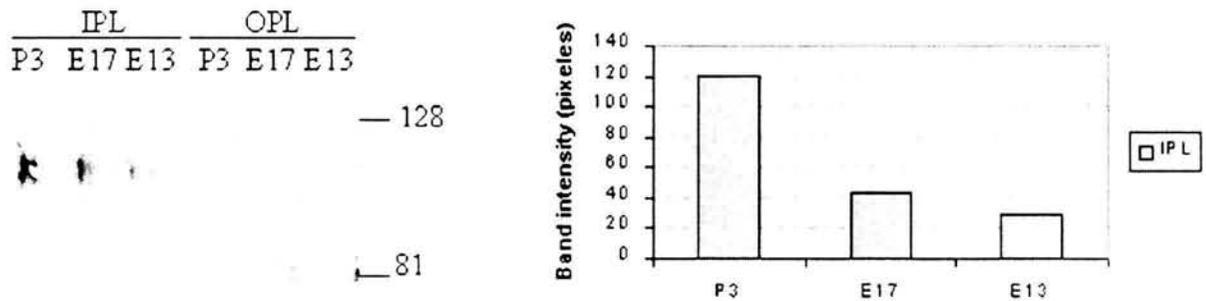


Fig. 7. Protein analysis of NR1 isoform expression in the chick retina. Western blots using antibodies against N1 and C1 cassettes were used to determine expression of NR1 isoforms during embryonic development of chick retina as described in Materials and Methods. The charts at right corresponds to the densitometric analysis of the gels shown at left. **A:** Protein expression of NR1 isoforms containing N1 cassette.

Lanes 1–3 correspond to expression in the inner plexiform layer (IPL). Lanes 4–6 correspond to expression in the outer plexiform layer (OPL). NR1 expression was monitored at E13, E17, and PH3. **B:** Protein expression of NR1 isoforms containing C1 cassette. Details as for A.

(Clarke, 1992; Wong, 1999). Because Ca^{2+} permeability of NMDARs is dependent on the heteromeric composition of these structures, the restricted expression of the C3-containing NR1 variant during this period (Figs. 4B, 5B) could be related to this process. The characterization of NMDARs containing this subunit will contribute to clarification of this point.

The results from this study clearly show structural differences of NMDARs in the chick retina compared with the brain and with mammalian retina, both in mature tissue and in developmental expression. Further functional analysis of avian C-terminal region remains to be performed to establish the mechanisms controlling the expression, synaptic localization, and developmental interplay of NMDAR subunits in the retina.

ACKNOWLEDGMENTS

The present work was partially supported by grant 31812-N from CONACyT and grant IN216501-2 from DGAPA to A.M.L.-C. We are grateful to Dr. N Kimura for providing the duck NR1a plasmid.

REFERENCES

- Anand H, Roberts PJ, López-Colomé AM. 1985. Excitatory amino acids in the chick retina: possible involvement of cyclic guanosine monophosphate. *Neurosci Lett* 58:31–36.
- Benveniste M, Mayer ML. 1993. Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *J Physiol* 464:131–163.
- Boje KM, Skolnick P, Raber J, Fletcher RT, Chader G. 1992. Strychnine-insensitive glycine receptors in embryonic chick retina: characteristics and modulation of NMDA neurotoxicity. *Neurochem Int* 20:473–486.
- Bookstein R, Lai CC, To H, Lee WH. 1990. PCR-based detection of a polymorphic BamHI site in intron 1 of the human retinoblastoma (RB) gene. *Nucleic Acids Res* 18:1666.
- Bottai D, Maler L, Dunn RJ. 1998. Alternative RNA splicing of the NMDA receptor NR1 mRNA in the neurons of the teleost electro-sensory system. *J Neurosci* 18:5191–5202.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Brandstätter JH, Hartveit E, Sassoe-Pognetto M, Wässle H. 1994. Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur J Neurosci* 6:1100–1112.

- Brandstätter JH, Koulen P, Wässle H. 1998. Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vis Res* 38:1385-1397.
- Bredariol ASD, Hamassaki-Britto D. 2001. Ionotropic glutamate receptors during the development of the chick retina. *J Comp Neurol* 441:58-70.
- Buller AL, Larson HC, Schneider BE, Beaton JA, Morrissett RA, Monaghan DT. 1994. The molecular basis of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition. *J Neurosci* 14:5471-5484.
- Calderón F, López-Colomé AM. 1998. Spermine inhibits [³H]glycine binding at the NMDA receptors from plexiform layers of chick retina. *Neurochem Res* 23:1363-1369.
- Clarke PG. 1992. Neuron death in the developing avian isthmo-optic nucleus, and its relation to the establishment of functional circuitry. *J Neurobiol* 23:1140-1158.
- Cogen J, Cohen-Cory S. 2000. Nitric oxide modulates retinal ganglion cell axon arbor remodeling in vivo. *J Neurobiol* 45:120-133.
- Cristóvão AJ, Oliveira CR, Carvalho CM. 2002. Expression of functional N-methyl-D-aspartate receptors during development of chick embryo retina cells: in vitro versus in vivo studies. *Brain Res Mol Brain Res* 99:125-133.
- Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W, Chen HS, Lipton SA, Nakanishi N. 1998. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 393:377-381.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Durand GM, Gregor P, Zheng X, Bennett MV, Uhl GR, Zukin RS. 1992. Cloning of an apparent splice variant of the rat N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR1 with altered sensitivity to polyamines and activators of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9359-9363.
- Durand GM, Bennett MV, Zukin RS. 1993. Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6731-6735.
- Ehlers MD, Zhang S, Bernhardt JP, Haganir RL. 1996. Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* 84:745-755.
- Ehlers MD, Fung ET, O'Brien RJ, Haganir RL. 1998. Splice variant-specific interaction of the NMDA receptor subunit NR1 with neuronal intermediate filaments. *J Neurosci* 18:720-730.
- Ellis JH, Richards DE, Rogers JH. 1991. Calretinin and calbindin in the retina of the developing chick. *Cell Tissue Res* 264:197-208.
- Fletcher EL, Hack I, Brandstätter JH, Wässle H. 2000. Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *J Comp Neurol* 420:98-112.
- Goodman C, Shatz C. 1993. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 72(Suppl):77-98.
- Gründer T, Kohler K, Kaletta A, Guenther E. 2000. The distribution and developmental regulation of NMDA receptor subunit proteins in the outer and inner retina of the rat. *J Neurobiol* 44:333-342.
- Hanawa J, Takashi K, Kawamoto N. 1976. A correlation of Embryogenesis of visual cells and early receptor potential in the developing retina. *Exp Eye Res* 23:587-597.
- Hollmann M, Heinemann S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
- Hollmann M, Boulter J, Maron C, Beasley L, Sullivan J, Pecht G, Heinemann S. 1993. Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron* 10:943-954.
- Hung T, Mak K, Fong K. 1990. A specificity enhancer for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 18:4953.
- Ientile R, Macaione V, Teletta M, Pedale S, Torre V, Macaione S. 2001. Apoptosis and necrosis occurring in excitotoxic cell death in isolated chick embryo retina. *J Neurochem* 79:71-78.
- Kashiwagi K, Masuko T, Nguyen C, Kuno T, Tanaka I, Igarashi K, Williams K. 2002. Channel blockers acting at N-methyl-D-aspartate receptors: differential effects of mutations in the vestibule and ion channel pore. *Mol Pharmacol* 61:533-545.
- Komau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH. 1995. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269:1737-1740.
- Kreutz MR, Böckers TM, Bockmann J, Seidenbecher CI, Kracht B, Vorwerk CK, Weise J, Sabel BA. 1998. Axonal injury alters alternative splicing of the retinal NR1 receptor: the preferential expression of the NR1b isoforms is crucial for retinal ganglion cell survival. *J Neurosci* 18:8278-8291.
- Kuenzel EA, Mulligan JA, Sommercorn J, Krebs EG. 1987. Substrate specificity determinants for casein kinase II as deduced from studies with synthetic peptides. *J Biol Chem* 262:9136-9140.
- Kurosawa N, Kondo K, Kimura N, Ikeda T, Tsukada Y. 1994. Molecular cloning and characterization of avian N-methyl-D-aspartate receptor type 1 (NMDA-R1) gene. *Neurochem Res* 19:575-580.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Laurie DJ, Seeburg PH. 1994. Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *J Neurosci* 14:3180-3194.
- Laurie DJ, Putzke J, Zieglansberger W, Seeburg PH, Tolle TR. 1995. The distribution of splice variants of the NMDAR1 subunit mRNA in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 32:94-108.
- Lieberman DN, Mody I. 1999. Casein kinase-II regulates NMDA channel function in hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 2:125-132.
- Lombardi G, Moroni F. 1994. Glutamate receptor antagonists protect against ischemia-induced retinal damage. *Eur J Pharmacol* 271:489-495.
- López-Colomé AM, Somohano F. 1989. Developmental changes in the specificity of excitatory amino acid receptors in the retina. Extracellular and intracellular messengers in the vertebrate retina. New York: Alan R. Liss Inc.
- López-Colomé AM, Somohano F. 1992. N-methyl-D-aspartate receptors in the retina: 3-[(+/-)-2-carboxypiperazin-4-yl]-propyl-1-phosphonic acid (CPP) binding studies. *Neuropharmacology* 31:577-584.
- López-Colomé AM, Lee I. 1996. Pharmacological characterization of inositol-1,4,5,-triphosphate binding to membranes from retina and retinal cultures. *J Neurosci Res* 44:149-156.
- Massey SC, Miller RF. 1990. N-methyl-D-aspartate receptors of ganglion cells in rabbit retina. *J Neurophysiol* 63:16-30.
- Meggio F, Marin O, Pinna LA. 1994. Substrate specificity of protein kinase CK2. *Cell Mol Biol Res* 40:401-409.
- Mey J, Thanos S. 2000. Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res Brain Res Rev* 32:343-379.
- 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.
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH. 1992. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256:1217-1221.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.
- Mori H, Mishina M. 1995. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 34:1219-1237.
- Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. 1991. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354:31-37.
- Nakanishi S, Masu M. 1994. Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23:319-348.

- Nakanishi S, Nakajima Y, Masu M, Ueda Y, Nakahara K, Watanabe D, Yamaguchi S, Kawabata S, Okada M. 1998. Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res Brain Res Rev* 26:230–235.
- Okabe S, Miwa A, Okado H. 1999. Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. *J Neurosci* 19:7781–7792.
- Prybylowski KL, Wolfe BB. 2000. Developmental differences in alternative splicing of the NR1 protein in rat cortex and cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 123:143–150.
- Rodríguez-Contreras A, Calderón F, López-Colomé AM. 1998. Strychnine-insensitive [³H]glycine binding to synaptosomal membranes from the chick retina. *Int J Dev Neurosci* 16:413–421.
- Sambrook J, Russell DW. 2002. *Molecular cloning, a laboratory manual*, vol 1. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p 7.31–7.34.
- Somohano F, Roberts PJ, López-Colomé AM. 1988. Maturation changes in retinal excitatory amino acid receptors. *Brain Res* 470:59–67.
- Standley S, Roche KW, McCallum J, Sans N, Wenthold RJ. 2000. PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* 28:887–898.
- Sugioka M, Fukuda Y, Yamashita M. 1998. Development of glutamate-induced intracellular Ca²⁺ rise in the embryonic chick retina. *J Neurobiol* 34:113–125.
- Tingley WG, Roche KW, Thompson AK, Huganir RL. 1993. Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature* 364:70–73.
- Tingley W, Ehlers M, Kameyama K, Doherty C, Ptak J, Riley C, Huganir R. 1997. Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J Biol Chem* 272:5157–5166.
- Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF. 1995. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* 268:873–876.
- Watanabe M, Mishina M, Inoue Y. 1994. Differential distributions of the NMDA receptor channel subunit mRNAs in the mouse retina. *Brain Res* 634:328–332.
- Whitmore D, Cermakian N, Crosio C, Foulkes NS, Pando MP, Travnickova Z, Sassone-Corsi P. 2000. A clockwork organ. *Biol Chem* 381:793–800.
- Williams K. 1995. Pharmacological properties of recombinant N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors containing the epsilon 4 (NR2D) subunit. *Neurosci Lett* 184:181–184.
- Wong RO. 1999. Retinal waves and visual system development. *Annu Rev Neurosci* 22:29–47.
- Zukin RS, Bennett MV. 1995. Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci* 18:306–313.