

## Artículos de revisión

# Modelo integrador para las rutas de señalización diferencial del receptor ionotrópico de glutamato activado por el N-metil-D-aspartato

*Integrative Model for Differential Signaling Pathways of the Ionotropic Glutamate Receptor Activated by N-methyl-D-aspartate*

Sonia Luz Albarracín, MSc,\* Leonardo R. Lareo, PhD\*\*

### Lista de siglas

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**iGluR-NMDA:** Receptor ionotrópico de glutamato activado por N-metil-D-aspartato

**NR1, NR2A-D, NR3A-B:** Subunidades constitutivas del receptor ionotrópico de glutamato activado por N-metil-D-aspartato

**PKA, PKC:** Fosfoquinasa A, fosfoquinasa C

**CaM quinasa:** Quinasa dependiente de Calmodulina

**MAP quinasa:** Quinasas activadas por mitógenos

**mGluR:** Receptores metabotrópicos de glutamato

**PSD:** Densidades de proteínas pos-sinápticas

**PSD-95, 93:** Proteínas de la densidad pos-sináptica de 95 kD y 93 kD de peso molecular

**PDZ:** Dominio denominada así por las tres proteínas en las que fue identificado por primera vez: PSD-95, la proteína supresora de tumores DLG en *Drosophila* y una proteína llamada ZO-1.

**Domino SH3:** Homólogo a la Scr. Dominio que interactúa con secuencias ricas en prolina o hélices de poliprolina usualmente en las rutas que involucran tirosina quinasa

**MAGUK:** Familia de proteínas consistente de tres dominios PDZ, un dominio SH3 y una región con homología a una guanilato ciclasa de levadura (GUK)

**Chapsyn 110:** Proteína humana formadora de canal, asociada con las sinapsis

**SAP 90, 97, 102:** Proteínas asociadas a sinapsis de pesos moleculares 90, 97 y 102 kD

**GUK:** Guanilato quinasa de levadura

**Src:** Proteína citoplasmática con actividad específica de tirosina quinasa, usualmente asociada con el lado citoplasmático de la membrana celular

**nNOS:** Oxido nítrico sintasa neuronal

**SynGAP:** Proteína activadora de la Ras-GTPasa sináptica que interactúa con la PSD-95

**Ras:** Familia de oncogenes cuyo nombre se deriva de sarcoma de rata (rat sarcoma)

Recibido: febrero 15 de 2007

Aprobado: mayo 3 de 2007

\* Bioquímica Computacional y Estructural y Bioinformática, Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Grupo de Investigación en Proteínas, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

Correo electrónico: albarra@javeriana.edu.co

\*\* Bioquímica Computacional y Estructural y Bioinformática, Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Correo electrónico: l.lareo@javeriana.edu.co

**GTP:** Guanosina trifosfato  
**NF1:** Neurofibromina  
**CaMKII:** Proteína quinasa II dependiente de Ca/calmodulina  
**GTPasa:** Familia de proteínas que pueden ligarse e hidrolizar GTP  
**GAP:** Glicer aldehído 3-fosfato deshidrogenasa  
**Densina-180** Proteína similar a la proteína asociada a lipopolisacárido (LAP2) y la Erbina que pertenecen a proteínas de las uniones estrechas celulares

## Resumen

El receptor ionotrópico de glutamato activado por N-metil-D-aspartato (**iGluR-NMDA**) es un complejo macromolecular heteromultimérico constituido por entre 3 y 5 subunidades de tres diferentes tipos, a saber: **NR1**, **NR2A-D** y **NR3A** y **B**. Se ha demostrado su participación activa en prácticamente todos los procesos fisiológicos, patológicos e intermediarios de efectos farmacológicos que ocurren en las células de tejidos excitables, inclusive se ha reportado su presencia en otros tejidos no excitables.

En el sistema nervioso central (SNC) participa en los procesos de aprendizaje, memoria, plasticidad, diferenciación, migración de la célula neural y apoptosis. Además, en los eventos de índole farmacológica se ha demostrado su intervención en excitotoxicidad, drogadicción y alcoholismo. Surge entonces la pregunta de cómo un mismo complejo macromolecular puede participar en tantos y tan diversos procesos.

La revisión de literatura en la que se demuestra la interacción del **iGluR-NMDA** con proteínas de señalización, soporte, adaptadoras, moduladoras, de adhesión celular, de citoesqueleto y enzimas reporta un conjunto de más de 160 moléculas que participan en las cascadas que generan las señales a diferentes niveles de interacción y con diferentes sustratos.

En este artículo se presenta un modelo predictivo estructural y funcional que permite distinguir, por lo menos, tres rutas diferenciadas de señalización.

**Palabras clave:** receptor, homeóstasis, regulación, cascadas, ionotrópico, neurona.

## Summary

The ionotropic glutamate receptor activated by N-methyl-D-aspartate (**iGluR-NMDA**) is a multiheteromeric complex constituted from by three to five subunits belonging to by three different kinds of subunits known as **NR1**, **NR2A-D** and **NR3A** and **B**. It is well established the participation of **iGluR-NMDA** complexes in a broad range of physiological, pathological, and as intermediary in pharmacological processes of neural systems.

In the CNS, **iGluR-NMDA** participates in learning, memory, plasticity, neural differentiation, neural migration, and apoptosis, among others. In addition, from the pharmacological point of view the **iGluR-NMDA** is playing a role in excitotoxicity, drugs-addiction and other dependences. How the same complex can participate in a significant broad group of neural activities is a valid question after a literature review.

A carefully analysis shows that **iGluR-NMDA** interacts, at some level, with a big number of intracellular proteins belonging to signaling proteins family, support proteins, modulator proteins, cytoskeleton, and enzymes, resulting in interactions with more than a 160 proteins, at different interaction levels and acting with intracellular proteins.

In this work we report a proposal for a model of differential signaling cascade pathways generated by the **iGluR-NMDA** gating. The model shows at least the possibility of three different signaling pathways.

**Key words:** Receptor, Homeostasis, Regulation, Pathways, Iontropic, Neuron.

## Introducción

Los receptores multiheteroméricos de glutamato, en especial el canal de calcio asociado al complejo macromolecular del receptor de glutamato activado por N-metil-D-aspartato (**iGluR-NMDA**), se localizan en la membrana pos-sináptica e interactúan con sistemas proteicos intracelulares a través de las cuales modulan la señalización originada por las acciones de los agonistas y co-agonistas en la membrana plasmática (1). A pesar de que las propiedades electrofisiológicas de los **iGluR-NMDA** y en general de todos los receptores ionotrópicos de glutamato están bien caracterizadas, muchas de sus actividades desencadenan cascadas de señalización son aún desconocidas.

Este artículo resume parte de las investigaciones reportadas en la literatura especializada sobre las proteínas que interactúan con el **iGluR-NMDA**. Con base en este conocimiento se presenta un modelo estructural y funcional predictivo para mecanismos de agrupamientos proteicos pos-sinápticos que generan diversas rutas o vías de señalización que integradas conforman las cascadas de señalización asociadas a este receptor. La fuente principal para la selección de la literatura con la que se realizó el análisis crítico que origina el modelo aquí presentado fue PubMed (2). Después de identificar los artículos a revisar se obtuvieron en forma completa desde diferentes fuentes como PubMed Central (3), ScienceDirect (4) y directamente de los autores.

## El complejo iGluR-NMDA

Se han identificado tres tipos de subunidades constitutivas del complejo reconocidas como **NR1**, **NR2** y **NR3**. Las subunidades tipo **NR1** presentan 8 isoformas codificadas por un solo gen con "splicing" alternativo (5); las **NR2** tienen 4 sub-

unidades diferentes codificadas cada una por su propio gen (6); las **NR3** están constituidas por dos subunidades codificadas por dos genes (7).

Los diferentes arreglos del **iGluR-NMDA** están ensamblados por lo menos con una copia de una de las variantes de la subunidad **NR1** (8), una o más copias de las subunidades **NR2** y una o más copias de la subunidad **NR3**. El complejo total puede tener un peso molecular entre 700 y 900 KDa (9). Es activado por el mayor neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central, el glutamato (10, 11, 12, 13), pero también presenta una serie de co-agonistas como la glicina, la D-serina (14) y moduladores como las poliaminas (15) y el potencial *redox* del entorno (16); además, es sensible a bloqueadores como el magnesio (17) y el zinc (8).

Es dependiente de voltaje y forma un canal catiónico, principalmente de calcio, de las membranas pos-sinápticas (18). Su función como canal iónico es compleja, ya que realiza simporte o cotransporte paralelo del calcio y el sodio extracelulares que fluyen hacia el medio intracelular y, simultáneamente, un antiporte o cotransporte antiparalelo con el potasio que fluye hacia el medio extracelular. Todas las subunidades del complejo presentan su N-terminal extracelular y el C-terminal intracelular. El dominio transmembranal está constituido por 3-5 estructurales helicoidales dependiendo del tipo de subunidad (19). Este complejo constituye la molécula clave para todos los procesos que ocurren en los tejidos excitables, en particular del sistema nervioso.

Además, presenta una serie de regulaciones génicas que hacen que exista diferenciación de formas del complejo según la zona del cerebro en donde se expresa y la edad del individuo (20, 21). El nivel de expresión, regulado por su promotor, tiene efectos espacio-temporales similares,

pero también muestra una alta sensibilidad a interacciones con factores como intoxicaciones con drogas y metales pesados, por ejemplo el plomo, y a restricciones nutricionales (22).

### Interacciones proteicas directas del iGluR-NMDA

Después de reconocer la amplia complejidad del **iGluR-NMDA**, de ignorar su estequiometría –cuya fórmula básica se puede resumir en  $[(NR1_x)_n (NR2Y)_m (NR3Z)_p]$ – y su estructura cuaternaria, desde ahora este macromolecular multiheteromérico se asume como una sola molécula funcional (23). Sus interacciones con otras proteínas se pueden clasificar directas del receptor –o de primer plano– e indirectas –o de segundo plano–, es decir, mediadas por otros tipos de proteínas.

Los tipos de proteínas de las interacciones de primer plano se pueden agrupar en las siguientes familias:

- a) proteínas de soporte y adaptadoras.
- b) Enzimas, entre las que se han identificado de las familias **PKA**, **PKC**, **CaM** quinasas, fosfatasas, tirosina quinasas y las de la vía de las **MAP** quinasas.
- c) Proteínas específicas de señalización, como las de la familia de las proteínas G.
- d) Proteínas de adhesión celular y citoesqueleto.

En las interacciones de segundo plano, es decir, interacciones mediadas por los grupos ya mencionados y originadas en la activación del **iGluR-NMDA**, se encuentran otros receptores como los metabotrópicos; canales como los de sodio y potasio, y moduladoras de la señalización. En la tabla 1 se presenta un resumen de algunas de las proteínas identificadas que interactúan en primer y segundo plano con el **iGluR-NMDA** (24).

**Tabla 1.** Resumen de las proteínas intracelulares que interactúan con el iGluR-NMDA en la estructura pos-sináptica según las familias descritas en el texto

Familia de proteínas	Componentes
<b>Receptores</b> (25)	iGluR6, iGluR7, mGluR1 $\alpha$
<b>Soporte y adaptadoras</b> (26-33)	PSD-95; ChapSyn110/PSD-93; Sap 102; GKAP7SAPAP; Shank; Homer; Yotiao; AKAP150; NSF; SynGAP
<b>Enzimas</b> (34-43)	<b>PKA</b> (Subunidad catalítica de la PKA; PKA-R1 $\alpha$ y $\beta$ ; PKA-R1a- $\alpha$ ; PKA-R2 $\alpha$ ; PKA-R2 $\beta$ ) <b>PKC</b> (PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ , PKC $\gamma$ , PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\eta$ , PKC $\theta$ , PKC $\iota$ , PKC $\lambda$ ) <b>CaM quinasas</b> (CaM quinasa II $\beta$ ; fosfo-CaM quinasa) <b>Fosfatasas</b> (PP1; PP2A; calciurina; PP5; PTP1B; PTP1C; PTP1D/SHP2) <b>Tirosina quinasas</b> (Src; Fyn; FAK; PYK2) <b>MAP quinasas</b> (pan ERK; ERK1; ERK2; ERK3; fosfo-ERK1/2 MEK1; MEK2; Rsk; Rsk-2; c-Raf1)
<b>Pequeñas proteínas G y Moduladoras</b> (53-55)	H-Ras; Rac1; SynGap; NF1; p120 ; GAP
<b>Otras proteínas de Señalización</b> (47, 51, 52)	Calmodulina; nNOS; PI3 quinasa; calpaina; PLC $\gamma$ ; citrón
<b>Adhesión Celular y Citoesqueleto</b> (48-50)	N-caderina; desmogleína; $\alpha$ -catenina; $\beta$ -catenina; $\gamma$ -catenina; L1; pp120cas; MAP2B; actina; espectrina; miosina (cerebral); tubulina; cortactina; cortBP-1; dinamina; HSP-70; CRIPT

## Interacciones proteicas indirectas del iGluR-NMDA

De las interacciones mediadas principalmente por proteínas de soporte, adaptadoras y moduladoras son particularmente importantes las que ocurren con otros receptores, como los receptores metabotrópicos de glutamato (**mGluR**), ya que están asociados a todas las cascadas de señalización reconocidas ampliamente a través de proteínas G. De manera clásica se clasificaron los receptores de glutamato según interactuaran o no con las proteínas G. A pesar de que no hay interacción directa o de primer plano entre los **iGluR-NMDA** y las proteínas G esto no implica que no existan interacciones de segundo plano generando vías de señalización que las incluyan. De estas interacciones de segundo nivel también son muy importantes las que ocurren con otras proteínas moduladoras de la señalización (25).

## Interacciones directas del iGluR-NMDA con proteínas de soporte y adaptadoras

El gran dominio C-terminal intracelular del **iGluR-NMDA** ha sido evidenciado como una estructura de anclaje en los microdominios pos-sinápticos en donde, particularmente, son significativas las interacciones con el complejo **PSD-95**, el mayor componente de las estructuras llamadas **PSD** o densidades pos-sinápticas (26). Esta estructura proteica pos-sináptica tiene como componentes mayores el **PSD-95**, el **PDZ**, el dominio **SH3** y la guanilato quinasa asociadas a **MAGUKs** membranales. Estas pueden contener múltiples dominios **PDZ**, que median en el ensamblaje de multicomponentes en las redes de señalización, activando por ejemplo la óxido nítrico sintasa neuronal (**nNOS**) por interacciones de la **NR1** con las **PSD-95** y **SAP-**

**90**, **SAP-97**, **SAP-102** (27) o **PSD-93** y **ChapSyn110** (28, 29).

Se han reconocido interacciones específicas del **iGluR-NMDA** con las tres copias del dominio PDZ, un dominio homólogo a la **Src 3 (SH)** y a una región con alta homología con la guanilato quinasa de levadura (**GUK**). Las interacciones con esta familia se han postulado muy importantes para la organización estructural y para los sitios de reconocimiento de contacto célula-célula (30).

En algunas situaciones particulares se ha evidenciado que las interacciones del **iGluR-NMDA** con el complejo **PSD-95** pueden ser compensadas por interacciones con **SAP-102** y **ChapSyn110/PSD-93** en células transfectadas con proteínas heterólogas e *in vivo*, donde los conjuntos de proteínas interactuantes se han podido co-inmunoprecipitar de los lisados celulares (31, 32, 33).

## Interacciones del iGluR-NMDA vía PSD-95 y proteínas asociadas

Recientemente se ha identificado la proteína **SynGAP** co-localizada con el **PSD-95** en todas las sinapsis glutamatérgicas excitatorias y en una pequeña proporción en las neuronas inhibitorias. La **SynGAP** interactúa con la forma activada de Ras ligado a **GTP** y estimula su actividad de **GTPasa**. Esta acción es similar a algunas **GAPs** de Ras más familiares, como la **P120**, **RasGAP** y la neurofibromina (NF1). La **SynGAP** es fosforilada por el complejo **Ca<sup>2+</sup>/CaMKII** que rápida y reversiblemente inhibe su actividad GAP. Dado que la **CaMKII** está asociada al **PSD** y que es el primer blanco del influjo de **Ca<sup>2+</sup>** a través del **iGluR-NMDA**, la **SynGAP** puede conferir la posibilidad de una coincidencia en la detección del influjo, ligando

su activación a la fosforilación, y así la inhibición de la **SynGAP** incrementaría la actividad de las MAP quinasas (34).

Las proteínas asociadas a **PSD-95**, **PSD-93** y **Chapsyn110** han sido identificadas interactuando con la **nNOS** a través de su dominio **PDZ** (35). La **nNOS** es regulada por la  $Ca^{+2}$ /CaMKII y constituye un blanco potencial cuando se incrementa el  $Ca^{+2}$  neuronal. Esta interacción se postula como el eje de la excitotoxicidad, pero recientemente se ha presentado también como un mecanismo de regulación de la actividad extracelular del **iGluR-NMDA** al interactuar el NO liberado al medio extracelular con una de las cisteínas expuestas del receptor. Las proteínas **PSD**, como la **PSD-95**, se consideran acopladoras de receptores, canales y enzimas gracias a la interacción entre dominios **PDZ-PDZ** para formar multicomplejos que generan el ambiente propicio para la especificidad en la señalización (36).

Algunos estudios (37, 38) muestran interacciones de las familias de cuatro proteínas denominadas **GKAP/SAPAP** con el complejo **PSD-95**. Esta interacción es aparentemente relevante para la conexión del **iGluR-NMDA** a través de estas proteínas adaptadoras con las de citoesqueleto, sin que esta constituya la única vía para esta interacción.

Se ha aislado un complejo **neuroligina-PSD-95** que evidencia la interacción *in vivo* de estas moléculas vía el tercer dominio de la **PZD**. Las neuroliginas son una familia de proteínas de la membrana neuronal cuyos dominios extracelulares interactúan con las **neurexinas**, moléculas neuronales de superficie para generar la adhesión celular. La hipótesis es que la interacción entre las **neurexinas** y **neuroliginas** puede ayudar a formar uniones intercelulares (39). Esta interacción del **iGluR-NMDA**, mediada por estas adaptadoras, permitiría explicar

el papel del receptor en las interacciones celulares durante el desarrollo (40).

Se ha aislado otra proteína que interactúa con el **PZD-3** del **PSD-95**, a la que se denominó citrón y que a su vez interactúa con la pequeña proteína Rac ligadora de **GTP**. Se cree que la citrón es el blanco para la regulación por **Rac** y **Rho GTPasas** (41).

### Proteínas quinasa asociadas al iGluR-NMDA

Una amplia variedad de proteínas quinasa ha sido implicada en la señalización intracelular mediada por **iGluR-NMDA**, incluyendo la proteína quinasa C (**PKC**), la **CaMKII**, las **MAP** quinasas, la familia Src de tirosina quinasas y las quinasas dependientes de AMPc (**PKA**). La mayor parte de la evidencia sugiere que, particularmente, dos de estas familias son las más directamente asociadas: la **CaMKII** y la **Src**. La **CaMKII** fue la primera molécula de señalización identificada como el mayor constituyente del **PSD** (42). El **iGluR-NMDA** ha sido reconocido como el principal blanco de la **CaMKII** en el **PSD** y al menos otras dos proteínas son señaladas como ligadoras de la **CaMKII** con una alta afinidad: la subunidad **NR2B** y una proteína de 190 kDa. Adicionalmente al **iGluR-NMDA**, la **SynGAP** y la **densina-180** son blancos de la fosforilación por la **CaMKII**. En cerebro existen solo dos de las cuatro isoformas naturales de **CaMKII**, la alfa y la beta (43).

El tejido neural es la fuente más abundante de muchas proteínas quinasa y fosfatasa, y la fosforilación de canales iónicos es el mecanismo más importante para modular la excitabilidad neuronal. El **iGluR-NMDA** posee sitios consenso de fosforilación sobre dominios intracelulares tipo quinasa, pero depende del influjo de calcio y es el responsable de la

potenciación a largo plazo (LTP) como mecanismo inicial del aprendizaje y la memoria que en neuronas presinápticas aumenta la liberación de glutamato incrementando el número de sinapsis glutaminérgicas (44).

También es ampliamente reconocido que la actividad del **iGluR-NMDA** tiene un punto de regulación en la fosforilación de los residuos intracelulares de tirosina y serina (45). La activación de la familia de las **Src** incrementa la probabilidad de apertura del canal de calcio asociado, sugiriendo una interacción importante y directa que regula la actividad del mismo (46).

La actividad espacio-temporal de las proteínas quinasa y fosfatasa son reguladas por un intrincado sistema de interacción proteína-proteína en el que influyen directamente las subunidades **NR1** en la cual se presenta interacción, básicamente, con **PKA** y **PKC** que a su vez se asocian con **Yotiao**, una proteína de unión a actina, activándola, mientras que la **PP1** la defosforila, inactivándola (47). Ambas quinasa y fosfatasa están localizadas muy cerca de sus sustratos formando multicomplejos de activación-desactivación de las señales **PP1** y **PP2**. Se han reportado fosfatasa de interacción con la **NR3A**. Muchos estudios relacionan la fosforilación con la plasticidad sináptica y el aprendizaje, ya que potencian la LTP, mientras que la actividad de fosfatasa se asocia con depresión a largo plazo (LDT); es decir, la coordinación fosforilación-defosforilación modula la plasticidad (7).

### Interacciones del iGluR-NMDA con proteínas del citoesqueleto y de adhesión celular

Los filamentos de **actina** se encuentran altamente concentrados en las densidades pos-sinápticas

y su estado de polimerización está íntimamente asociado con la actividad del canal del **iGluR-NMDA**. Se ha identificado una proteína intermedia en esta interacción a la que se la denominó  **$\alpha$ -actinina 2** que pertenece a la familia de las **espectrinas/destrofinas** y es capaz de ligar a la **Ca<sup>2+</sup>/calmodulina**. La  **$\alpha$ -actinina 2** y la **calmodulina** compiten por el mismo sitio de interacción con **iGluR-NMDA** en el sitio sensible a interacción con **Ca<sup>2+</sup>**, esto implica que las concentraciones locales de calcio regulan el estado de acoplamiento del **iGluR-NMDA** al citoesqueleto (48).

La proteína **Yotiao** es un partícipe, cuya función aún no es completamente clara, que incrementa la agregación y complejidad de la interacción **iGluR-NMDA/citoesqueleto**. Además, el **iGluR-NMDA** se conecta indirectamente con los microtúbulos vía de la proteína llamada **CRIP1** que, específicamente, interactúa con el tercer dominio de la **PZD** del **PSD-95**. Particularmente se reconoce la interacción del receptor con la  **$\beta$ -tubulina** (49).

Otra interacción entre el **iGluR-NMDA** y los microtúbulos está mediada a través del dominio GK de la **Chapsyn110/PSD-93** que tiene la habilidad de ligar la **MAP1A** asociada a los microtúbulos (50).

La activación de calmodulina dependiente de calcio se da por la **CaMKII**. El calcio se une a la calmodulina formando un complejo, **CaM<sub>Ca</sub>**, considerado un segundo mensajero que activa la  **$\alpha$ -CaMKII** que a su vez actúa con proteínas de citoesqueleto tipo  **$\alpha$ -actina**, **miosina V** y **f-actina**. Sin embargo,  **$\alpha$**  y las formas  **$\beta$ -CaMKII** también puede interactuar con  **$\alpha$ -actinina** por la fracción C-terminal o dominio de quinasa independiente de calcio por autofosforilación; a su vez, la  **$\alpha$ -actinina** puede unir otro tipo de proteínas como **f-actina**,

**densina-180**, las subunidades **NR1** y **NR2B**.  **$\alpha$ -actinina** también puede formar complejos terciarios con **CaMKII** y **densina-180**, mientras que **CaMKII** y **calmodulina** forman complejos por la unión con **NR1**; por esta razón,  **$\alpha$ -actinina** puede considerarse un regulador de la interacción de las **CaMKII** con otras proteínas (51, 52).

Las **CaMKII** en neuronas presinápticas están relacionadas con asociaciones a vesículas sinápticas y **sinaptina 1** por fosforilación, y en neuronas pos-sinápticas con interacciones  $\text{Ca}^{+2}$ -**calmodulina** con la interacción con **NR1** y **NR2B** que requiere autofosforilación (53).

## Interacciones del **iGluR-NMDA** con moléculas de señalización nuclear

La neurotransmisión está acoplada a la inducción de genes por vías de señalización que activan el elemento de respuesta a cAMP (**CREB**) que influye en la transcripción de genes como **cfos**, **zif/268**, **sinaptina I**, **junB** y genes que se relacionan con aprendizaje y memoria. También el  $\text{Ca}^{+2}$  que entra al núcleo puede activar quinasas nucleares que activan **CREB** (54, 55). Ambos mecanismos se dan en neuronas en diferentes circunstancias. Otros posibles mecanismos reportados están relacionados con la interacción de otras moléculas de señalización como **NO**, **cGMP**, **PKG** y proteínas quinasa dependientes de  $\text{Ca}^{+2}$ /**calmodulina**.

El aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular activa también vías de señalización que inducen la expresión de genes esenciales para el desarrollo dendrítico, supervivencia neuronal y plasticidad sináptica. Además de las vías ilustradas para **CREB** se ha reportado **MEF-2** particularmente responsable de la actividad de receptores dependientes de voltaje entre los que

se describe el **iGluR-NMDA** debido a la presencia de un motivo "IQ" que promueve la interacción  $\text{Ca}^{+2}$ /**calmodulina**. Cuando la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular disminuye ligeramente, se activan las vías de señalización mediadas por **MAP** quinasas (53).

## Modelo propuesto

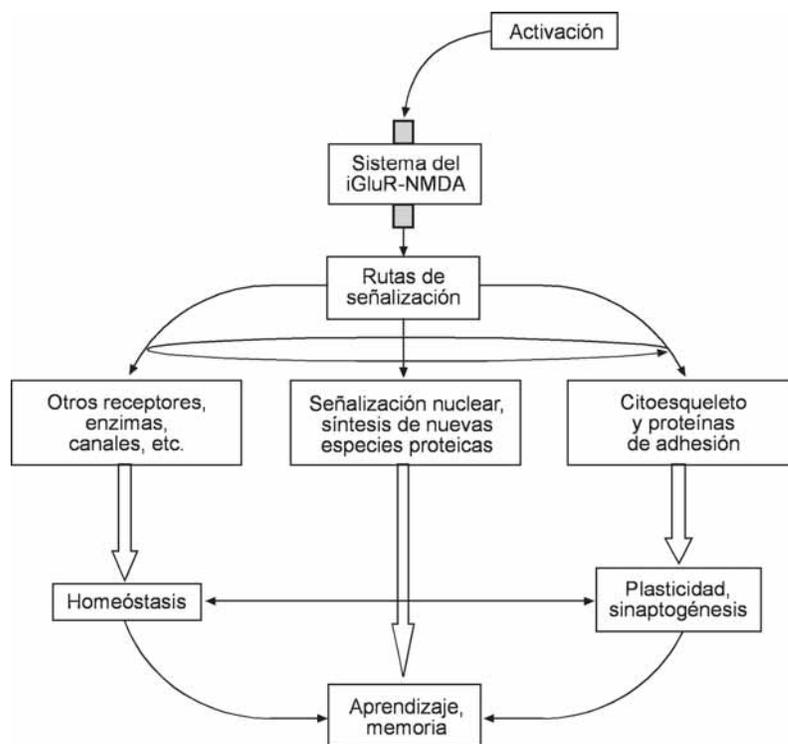
Con base en las interacciones descritas es evidente que la generación de una corriente excitatoria pos-sináptica a través de un receptor ionotrópico glutamatérgico como el **iGluR-NMDA** es más complejo que la sola interacción del agonista con la molécula.

Teniendo en cuenta que todas las vías de señalización propuestas interactúan íntimamente entre sí en algún nivel de sus actividades, se propone que, dependiendo directamente del influjo de calcio a la estructura post-sináptica, se pueden presentar algunas de las siguientes tres rutas:

1. La ruta que mediada por proteínas de soporte y adaptadoras activa y regula otros receptores, canales y proteínas que usualmente han sido descritas como ruta normal a través de proteínas G. Esta ruta está especializada en:
  - a. Desencadenar los procesos vinculados al **iGluR-NMDA** que conllevan respuestas en las que se activan otros receptores para actuar en forma sincrónica con los canales de  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ .
  - b. Mecanismos mediados por los receptores metabotrópicos que involucran señalización a través del sistema de proteínas G.
  - c. Otros receptores ionotrópicos para regular los flujos catiónicos. Esta ruta es responsable, principalmente, de mantener la homeostasis del sistema para que el complejo de receptores opere normalmente; es decir, mantener el potencial de membrana, las

- diferencias de concentraciones intra y extracelulares de iones, el balance del metabolismo energético, entre otros.
2. La ruta que se desencadena directamente a través de fosforilaciones y transmite su mensaje a diferentes niveles, siendo el más íntimo el que alcanza las regulaciones génicas y expresión de proteínas *de novo* que participarán en diferentes procesos. Esta ruta es también vinculada a procesos energéticos de donde se derivan los grupos fosfato, así como la regulación de radicales libres a través de la mediación regulada de la **nNOS**; es una de las rutas que, posiblemente, se afecta más durante las condiciones de estrés oxidativo asociadas a la aparición de enfermedades neurodegenerativas.
  3. La vía que interactúa con el citoesqueleto y sus proteínas asociadas para modificar la forma de la célula misma. Esta ruta se relaciona con todos los procesos de plasticidad y sinaptogénesis y, en consecuencia, es fundamental para los procesos de aprendizaje y memoria.
- La figura 1 presenta un modelo básico de las posibles rutas de señalización diferencial del **iGluR-NMDA**, sus posibles resultados mayores, así como la integración entre las diferentes rutas a varios niveles de las mismas para dar origen a la cascada completa.

Figura 1. Esquema de las rutas de señalización diferencial propuestas para el iGluR-NMDA



Los procesos se separarían temporalmente así: de corto plazo, las que van a través las vías de fosforilación o modificaciones covalentes; de mediano plazo, las que actúan sobre citoesqueleto; de largo plazo, a las señalizaciones que modifican o activan la regulación génica. Aunque la segunda parte de la hipótesis del modelo asume que la temporalidad y direccionalidad de la señalización dependen de los flujos de calcio, aún no es claro cuáles son los umbrales para diferenciar cada ruta específica de señalización. Se están diseñando evaluaciones experimentales para validar este aspecto.

Por otro lado, aún no se conocen todas las posibles interacciones que se generan por alteraciones en los procesos normales de señalización y que apenas están siendo objeto de estudios detallados por medio de la proteómica (24, 56, 57). Con los datos que surjan de estos estudios será posible comprender y mejorar la calidad de este modelo, de tal forma que sea posible intervenir en dichas cascadas de señalización, alteradas en las patologías, para recuperar el funcionamiento normal del receptor.

A pesar de que las rutas de señalización distan de ser lineales, esto es, con una única interacción entre las proteínas involucradas, y constituyen realmente un red intrincada de interacciones ordenadas y algunas de ellas simultáneas –es decir, que un miembro de la cascada puede estar participando simultáneamente en más de una interacción que producirá en la neurona efectos diferentes que dependen de con quién realice la interacción, como se pretende mostrar en una forma por demás simple en el modelo propuesto– es posible describir, en una primera aproximación, las interacciones principales de cada cascada que se desencadena por la activación del **iGluR-NMDA**. Esta aproximación se presenta a continuación, aclarando que muchas de las proteínas que se ci-

tarán en este párrafo no fueron discutidas en el texto, pues su consideración sobrepasa la capacidad del mismo.

Una de las muchas rutas posibles del acápite 1 del modelo propuesto incluyen secuencias como:

**iGluR-NMDA** → **CaMKII** → **CaM** → **SynGAP** → **Ras/Rap2** → **Ca<sup>2+</sup>-ATPasa** → **CaM** → **ChapSyn110** → **PSD-95** → **canal de K<sup>+</sup>** → **PSD-95** → **Sank** → **GKAP** → **PLCγPLA<sub>2</sub>** → **Proteínas G** → **mGluR<sub>1</sub>**

Para el acápite 2 una de las rutas posibles es:

**iGluR-NMDA** → **PSD-95** → **CaM** → **MAPK** → **RSK** → **CaMKIV** → **ELK1** → **SRF** → **Fos** → **Jun** → **CREB** → **TBP** → **POLR2**

Para el acápite 3 del modelo propuesto una ruta posible es:

**iGluR-NMDA** → **CaM** → **Yotiao** → **PKA-c** → **PKA-R2β** → **α-actina2/espectrina** → **F-actina** → **Miosina**

Otra posibilidad para el acápite 3 es:

**iGluR-NMDA** → **CaMKII** → **CaM** → **SynGap** → **PSD-95** → **MAP1** → **Tubulina** → **MAP2B** → **F-actina**

El hecho de haber tenido que introducir proteínas no referenciadas en el texto para poder completar alguna de las posibles rutas de señalización, iniciadas por la activación del **iGluR-NMDA**, pone de presente la gran complejidad del proceso de señalización neuronal y evidencia la posible utilidad del modelo al poder, con base en él, aislar un conjunto de cascadas y estudiarlas independientemente de las demás para que, una vez se haya establecido el conocimiento sobre el mecanismo intrínseco, se puedan iniciar los estudios de interacciones de todas las cascadas y comprender mejor el papel del receptor; con la posibilidad de encontrar formas de regularlo con estímulos basados en sustancias exógenas administradas en forma controlada.

## Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias al apoyo de la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana a través del proyecto “Modelo para simular la homeóstasis del calcio debido a un influjo incrementado a través del canal asociado al receptor NMDA”, con registro número 880.

## Referencias

1. Dannhardt G, Kohl BK. The glycine site on the NMDA receptor: structure-activity relationships and possible therapeutic applications. *Current Med Chem* 1998; 5: 253-263.
2. PubMed. Maryland (Bethesda). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
3. PubMed Central. Maryland (Bethesda). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>
4. Science Direct. Available for suscription from: <http://www.sciencedirect.com>
5. Nakanishi N, Axel R, Shneider NA. Alternative splicing generates functionally distinct N-methyl- D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89:8552-8556.
6. Blahos J, Wenthold RJ. Relationship between N-methyl-D-Aspartate receptor NR1 splice variants and NR2 subunits. *J Biol Chem* 1996; 271: 15669-15674.
7. Andersson O, Stenqvist A, Attersand A, von Euler G. Nucleotide sequence, genomic organization, and chromosomal localization of genes encoding the human NMDA receptor subunits NR3A and NR3B. *Genomics* 2001; 78: 178-184.
8. McBain CJ, Mayer ML. N-Methyl-D-Aspartate receptor structure and function. *Physiol Rev*. 1994; 74: 723-760.
9. Di Luca M, Ruts L, Gardoni F, Cattabelli F, Biessels GJ, Gispen WH. NMDA receptor subunits are modified transcriptionally and post-translationally in the brain of streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1999; 42: 693-701.
10. Roberts PJ, Store-Mathisen J, Johnston GAR. (Eds.) *Glutamate: Transmitter in the Central Nervous System*. New York: John Wiley; 1981.
11. Chichester A, Di Chiara G, Gessa GL. (Eds.) *Glutamate as Neurotransmitter*. New York: Raven Press; 1981.
12. Stone TW (Ed.). *CNS Neurotransmitters and Neuromodulators: Glutamate*. Boca Raton: CRC Press; 1995.
13. Ottersen OP, Langmoen IA, Gjerstad L. (Eds.). *The Glutamate Synapse as a Therapeutical Target: Molecular Organization and Pathology of the Glutamate Synapse*. Amsterdam: Elsevier; 1998.
14. Fadda E, Danysz W, Wroblewski JT, Costa E. Glycine and D-serine increase the affinity of N-methyl-D-aspartate sensitive glutamate binding sites in rat brain synaptic membranes. *Neuropharmacology* 1988; 27: 1183-1185.
15. Kashiwagi K, Pahk AJ, Masuko T, Igarashi K, Williams K. Block and modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by polyamines and protons: Role of amino acid residues in the transmembrane and pore-forming regions of NR1 and NR2 subunits. *Mol Pharm*. 1997; 52: 701-713.
16. Omerovic A, Chen SJ, Leonard JP, Kelso SR. Subunit-specific redox modulation of NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Recept Signal Transduct Res*. 1995; 15: 811-827.

17. Kato N, Yoshimura H. Reduced  $Mg^{2+}$  block of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic potentials in developing visual cortex. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1993; 90: 7114-7118.
18. Cushing A, Price-Jones MJ, Graves R, Harris AJ, Hughes KT, Bleakman D, *et al.* Measurement of calcium flux through ionotropic glutamate receptors using Cytostar-T scintillating microplates. *J Neurosci Meth.* 1999; 90: 33-36.
19. Hollman M. The topology of glutamate receptors. In: *The Ionotropic Glutamate receptors* D. T. Monaghan and R. J. Wenthold (Eds.) Totowa, New Jersey: Humana Press; 1997, pp. 39-80.
20. Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M. Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport.* 1992; 3: 1138-1140.
21. Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M. Distinct distributions of five N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the forebrain. *J Comp Neurol.* 1993; 338: 377-390.
22. Haney M, Collins ED, Ward AS, Foltin RW, Fischman MW. Effect of a selective dopamine D1 agonist (ABT-431) on smoked cocaine self-administration in humans. *Psychopharmacol. (Berl).* 1999; 143: 102-110.
23. Premkumar LS, Auerbach A. Stoichiometry of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels inferred from single-channel current patterns. *J Gen Physiol.* 1997; 110: 485-502.
24. Husi H, MA Ward, JS Chouharty, WP Blackstock and SGN Grant. Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nature Neurosci.* 2001; 3: 661-669.
25. Valtschanoff JG, Weinberg RJ. Laminar organization of the NMDA receptor complex within the postsynaptic density. *J Neurosci.* 2001; 21: 1211-1217.
26. Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, *et al.* Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science.* 1992; 256: 1217-1221.
27. Fukaya M, Watanabe M. Improved immunohistochemical detection of postsynaptically located PSD-95/SAP90 protein family by protease section pretreatment: a study in the adult mouse brain. *J Comp Neurol.* 2000; 426: 572-586.
28. Kim E, Cho KO, Rothschild A, Sheng M. Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron.* 1996; 17: 103-113.
29. Nada S, Shima T, Yanai H, Husi H, Grant SG, Okada M, *et al.* Identification of PSD-93 as a substrate for the Src family tyrosine kinase Fyn. *J Biol Chem.* 2003; 278: 47610-47621.
30. Iwamoto T, Yamada Y, Hori K, Watanabe Y, Sobue K, Inui M. Differential modulation of NR1-NR2A and NR1-NR2B subtypes of NMDA receptor by PDZ domain-containing proteins. *J Neurochem.* 2004; 89: 100-108.
31. Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PT. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science.* 1995; 269: 1737-1740.
32. Kornau HC, Seeburg PH, Kennedy MB. The synaptic protein network associated with ionotropic glutamate receptors. En: *Ionotropic glutamate receptors in the CNS.* Jonas P, Monyer H. (Eds.) Berlin: Springer-Verlag; 1999, pp. 121-142.
33. Garcia RA, Vasudevan K, Buonanno A. The neuregulin receptor ErbB-4 interacts with PDZ-containing proteins at neuronal synapses. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2000; 97: 3596-3601.
34. Koulen P, Fletcher EL, Craven SE, Brecht DS, Wassle H. Immunocytochemical localization of the postsynaptic density protein PSD-95 in the mammalian retina. *J Neurosci.* 1998; 18: 10136-10149.

35. Ishii H, Shibuya K, Ohta Y, Mukai H, Uchino S, Takata N, *et al*, Enhancement of nitric oxide production by association of nitric oxide synthase with N-methyl-D-aspartate receptors via postsynaptic density 95 in genetically engineered Chinese hamster ovary cells: real-time fluorescence imaging using nitric oxide sensitive dye. *J Neurochem.* 2006; 96: 1531-1539.
36. Lin JW, Wyszynski M, Madhavan R, Sealock R, Kim JU, Sheng M. Yotiao, a novel protein of neuromuscular junction and brain that interacts with specific splice variants of NMDA receptor subunit NR1. *J Neurosci.* 1998; 18: 2017-2027.
37. Yoshimura Y, Yamauchi Y, Shinkawa T, Taoka M, Donai H, Takahashi N, *et al*, Molecular constituents of the postsynaptic density fraction revealed by proteomic analysis using multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Neurochem.* 2004; 88:759-768.
38. Peng J, Kim MJ, Cheng D, Duong DM, Gygi SP, Sheng M. Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. *J Biol Chem.* 2004; 279: 21003-21011.
39. Nam CI, Chen L. Postsynaptic assembly induced by neurexin-neuroigin interaction and neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 6137-6142.
40. Song JY, Ichtchenko K, Sudhof TC, Brose N. Neuroigin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 1100-1105.
41. Okabe S, Urushido T, Konno D, Okado H, Sobue K. Rapid redistribution of the postsynaptic density protein PSD-Zip45 (Homer 1c) and its differential regulation by NMDA receptors and calcium channels. *J Neurosci.* 2001; 21: 9561-9571.
42. Suzuki T, Okumura-Noji K, Tanaka R, Tada T. Rapid translocation of cytosolic Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II into postsynaptic density after decapitation. *J Neurochem.* 1994; 63: 1529-1537.
43. Aradi I, Holmes WR. Role of multiple calcium and calcium-dependent conductances in regulation of hippocampal dentate granule cell excitability. *J Comp Neurosci.* 1999; 6: 215-235.
44. Ding JM, Faiman LE, Hurst WJ, Kuriashkina LR, Gillete MU. Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J Neurosci.* 1997; 17: 667-675.
45. Ferrani-Kile K, Leslie SW. Modulation of protein tyrosine phosphatase activity alters the subunit assembly in native N-methyl-D-aspartate receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 314: 86-93.
46. Yu XM, Askalan R, Keil GJ, Salter MW. NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosine kinase Src. *Science.* 1997; 275: 674-678.
47. Westphal RS, Tavalin SJ, Lin JW, Alto NM, Fraser IDC, Omerovic LK, *et al*, Subunit-specific redox modulation of NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Recept Signal Transduct Res.* 1995; 15: 811-827.
48. Yuen EY, Jiang Q, Feng J, Yan Z. Microtubule regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in neurons. *J Biol Chem.* 2005; 280: 29420-29427.
49. Van Rossum D, Kuhse J, Betz H. Dynamic interaction between soluble tubulin and C-terminal domains of N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Neurochem.* 1999; 72: 962-973.
50. Brenman JE, Topinka JR, Cooper EC, McGee AW, Rosen J, Milroy T, *et al*, Localization of postsynaptic density-93 to dendritic microtubules and interaction with microtubule-associated protein 1A. *J Neurosci.* 1998; 18: 8805-8813.
51. Gardoni F, Polli F, Cattabeni F, Di Luca M. Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation modulates PSD-95 binding to NMDA receptors. *Eur J Neurosci.* 2006; 24: 2694-2704.

52. Thalhammer A, Rudhard Y, Tigaret CM, Volynski KE, Rusakov DA, Schoepfer R. CaMKII translocation requires local NMDA receptor-mediated  $Ca^{2+}$  signaling. *EMBO J.* 2006; 25: 5873-5883.
53. Bayer KU, De Koninck P, Leonard AS, Hell JW, Schulman H. Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature.* 2001; 411: 801-805.
54. Hardingham GE, Cruzalegui FH, Chawla S, Bading H. Mechanisms controlling gene expression by nuclear calcium signals. *Cell Calcium.* 1998; 23: 131-134.
55. Hardingham GE, Bading H. Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1600:148-153.
56. Grant SGN, Blackstock WP. Proteomics in neuroscience: From protein to network. *J Neurosci.* 2001; 21: 8315-8318.
57. Grant SGN. Synapse signaling complexes and networks: machines underlying cognition. *Bioessays.* 2003; 25: 1229-1235.