

RELACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES NMDA CON SU FUNCIÓN EN LA RETINA

IRENE LEE-RIVERA¹ Y ANA MARÍA LÓPEZ-COLOMÉ^{1*}

¹Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Apdo. Postal 70-253, C.P. 04510. México, D.F., México. E-mail: *acolome@ifc.unam.mx

RESUMEN

La función del glutamato en la retina, como neurotransmisor, factor trófico o neurotoxina, se relaciona directamente con la diversidad y la composición heteromérica de sus receptores. Los receptores de glutamato de tipo NMDA (NMDARs) son tetrámeros integrados por dos subunidades NR1, que forman un canal iónico permeable al calcio, y subunidades NR2 y NR3, que modulan su actividad.

Los NMDARs de la retina incluyen subunidades NR2, así como variantes postranscripcionales de NR1 específicas, tanto en el tejido diferenciado como el embrionario, cuya estructura determina diferencias funcionales significativas entre el cerebro y la retina. Consecuentemente, fármacos que protegen a las neuronas de la excitotoxicidad del glutamato en el cerebro, no tienen efecto en la retina.

La repercusión clínica de estos resultados es evidente, ya que permitirá, en el futuro, el diseño de compuestos protectores de la muerte neuronal en la retina en padecimientos relacionados con la elevación de la concentración extracelular del glutamato, como el glaucoma, la oclusión vascular, la neuropatía óptica y la isquemia, entre otros.

Palabras Clave: Desarrollo embrionario, neurotransmisión, NR1, NR2, receptor de glutamato.

ABSTRACT

The multiple actions of glutamate in the retina, as a neurotransmitter, a trophic factor or a neurotoxin, are directly related to the heteromeric composition of the NMDA type of glutamate receptors present in this tissue. The tetrameric NMDARs include two NR1 subunits which form the calcium-permeable cation channel, in addition to NR2 and NR3 subunits which modulate its activity.

Recent results demonstrate that retinal NMDARs might include tissue-specific NR1 splice variants and NR2 subunits, in both mature and embryonic tissue, which determine structural and functional differences with brain receptors. As a consequence, drugs shown to protect brain neurons from glutamate-induced neuronal death, are ineffective in the retina.

The clarification of the precise subunit composition of NMDARs in the retina will allow the future design of drugs aimed to prevent neuronal loss in pathological conditions such as glaucoma, vascular occlusion, optic neuropathy and ischemia, in which glutamate excitotoxicity seems to be involved.

Key Words: Embryonic development, neurotransmission, NR1, NR2, glutamate receptors.

INTRODUCCIÓN

El glutamato (Glu) es el neurotransmisor excitador más importante en el Sistema Nervioso Central (SNC). Se ha demostrado su relevancia en funciones normales como el aprendizaje y la memoria, así como con la muerte de neuronas específicas en numerosas enfermedades convulsivas

y neurodegenerativas entre las que se cuentan la epilepsia, el Alzheimer, la isquemia, la anoxia y el infarto¹.

En el sistema nervioso diferenciado, el Glu juega un papel preponderante como neurotransmisor ya que induce cambios duraderos de la excitabilidad neuronal, que son esenciales para procesos como la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD), procesos en los que se basa el

almacenamiento de información en el cerebro.

Durante el desarrollo embrionario (DE), el Glu es un estímulo químico importante para la diferenciación de las neuronas y la formación de sinapsis específicas entre ellas (sinaptogénesis), y se requiere para la supervivencia de algunas neuronas en cultivo. Asimismo, se ha demostrado que la activación de los receptores de Glu de la corteza cerebral embrionaria induce la reducción selectiva de la síntesis de ADN en las neuronas progenitoras, lo que disminuye la división celular y promueve su diferenciación. En etapas posteriores del DE, el Glu estimula la iniciación de la migración neuronal y la formación de estratos en la corteza cerebral, y modula tanto el crecimiento de los axones como la formación de sinapsis en la retina, el núcleo geniculado y la corteza visual¹.

La diversidad de los efectos producidos por el Glu se debe a: a) su interacción con múltiples tipos de receptores que activan diversas rutas intracelulares de señalamiento, y b) su concentración extracelular. En concentraciones del orden nM el Glu funciona como neurotransmisor o como factor trófico, mientras que la elevación de su concentración extracelular al orden de mM puede inducir la muerte de las neuronas por sobreexcitación, fenómeno conocido como excitotoxicidad².

La vía principal de neurotransmisión en la retina de los vertebrados, desde los fotorreceptores hasta las células ganglionares, es excitadora y utiliza al Glu como neurotransmisor^{2,3} por lo que, para entender cómo se establecen los circuitos sinápticos que codifican los estímulos luminosos y cómo se transmite esta información desde los fotorreceptores de la retina hasta el cerebro, es indispensable identificar el tipo de receptores de Glu expresados por los distintos tipos celulares involucrados en el proceso.

Esta revisión se enfoca en los estudios que han permitido la identificación y caracterización de los receptores de Glu de tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDA), por la importancia de su función en la neurotransmisión en la retina, particularmente en las sinapsis de la capa plexiforme interna (IPL;⁴) tanto en condiciones normales como patológicas.

LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO Y SU CLASIFICACIÓN

El Glu ejerce sus funciones a través de la interacción con dos grupos de receptores específicos: ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores metabotrópicos se acoplan, a través de proteínas G triméricas, a la activación de cascadas de señalamiento intracelular. Los receptores ionotrópicos, en contraste, son canales catiónicos inespecíficos activados por un ligando, formados por cuatro subunidades proteicas¹.

Los receptores de tipo metabotrópico (mGluRs) se clasifican en tres grupos, con base en la similitud de su secuencia de aminoácidos, sus propiedades farmacológicas y sus

mecanismos de transducción de señales. La estimulación de los mGluRs del grupo I (mGluR1 y mGluR5) activan a la Fosfolipasa C (PLC), mientras que la activación de los mGluRs del Grupo II (mGluR2 y mGluR3) y del Grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) se traduce en la inhibición de la adenilil ciclasa. Los receptores del grupo I se ubican principalmente en la membrana postsináptica, en tanto que los de los grupos II y III se localizan mayoritariamente en la presinápsis y actúan como moduladores de la liberación, tanto del Glu, como de otros neurotransmisores⁵.

Los receptores Ionotrópicos de Glu se clasifican con base en la afinidad por sus agonistas y la similitud de sus secuencias, en receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico/kaínico (AMPA/KA) (no-NMDA), y receptores NMDA (NMDARs). Se ha propuesto que estos agonistas representan al L-Glu en sus conformaciones extendida (kaínico) y plegada (NMDA) y se relacionan, respectivamente, con la respuesta rápida en la transmisión sináptica y con el componente lento de las corrientes iónicas postsinápticas¹.

La interacción del Glu con sus diferentes receptores genera una amplia gama de respuestas en las sinapsis glutamatérgicas. Esta diversidad se incrementa tanto por la generación de variantes postranscripcionales de las subunidades a través de la edición y el empalme alternativo del mRNA, como por mecanismos de modificación postraduccional como la fosforilación y la desfosforilación de los receptores y la regulación de su expresión en la membrana¹.

ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES DE TIPO NMDA

Los receptores de Glu de tipo NMDA (NMDARs) forman un canal iónico que permite la entrada de Ca^{++} y en menor medida, de Na^{+} . La actividad de los NMDARs está finamente controlada a través de seis sitios específicos de modulación (Figura 1). Además del sitio de reconocimiento con el cual interactúan los agonistas como el Glu y el NMDA y los antagonistas competitivos, los NMDARs tienen un sitio al que se unen como coagonistas, la glicina y/o la D-serina; un sitio en el canal iónico al que se une el Mg^{++} , que regula la actividad del canal en forma dependiente del voltaje; un sitio más externo en el canal, con el cual interactúan anestésicos disociativos como la dizocilpina (MK-801), la ketamina y la fenciclidina (PCP), que inhiben al 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 se inhibe por el ifenprodil⁶.

Los NMDARs están formados por cuatro subunidades que se ensamblan de manera variable. Se han clonado los genes de tres familias de estas subunidades: GRIN1, GRIN2 y GRIN3 que codifican, respectivamente, a las subunidades NR1, NR2 y NR3⁷⁻⁹. La subunidad NR1 forma el canal iónico y es esencial para la función del receptor. Se conocen 8 variantes postranscripcionales de NR1 (NR1a-h) generadas por el empalme

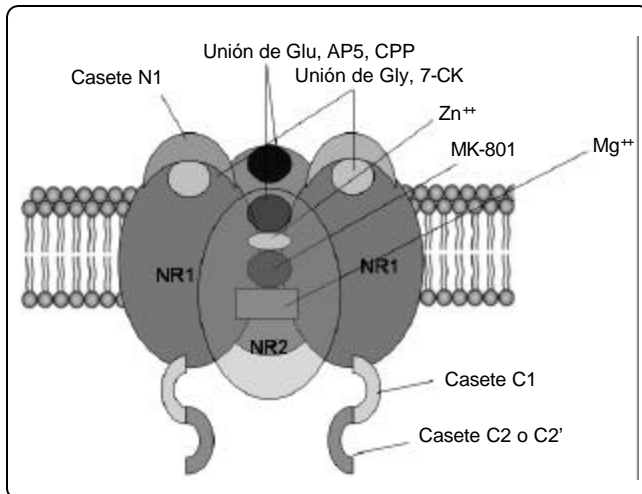


Figura 1. Estructura de los receptores NMDA. Los NMDARs están formados por cuatro subunidades, dos de tipo NR1 y dos NR2. El Glu, sus agonistas y sus antagonistas competitivos se unen a un sitio en la NR2, en tanto que la glicina y la D-serina se unen al sitio del coagonista, en la NR1. Los sitios de modulación por Zn⁺⁺ y Mg⁺⁺, así como el sitio de unión del bloqueador MK-801 residen en el interior del canal.

alternativo de 3 exones en el mRNA: el exón 5, que codifica a un casete (N1) en el extremo N-terminal de la proteína, y los exones 21 y 22 en el extremo carboxilo de la proteína, que codifican, respectivamente, a los casetes C1 y C2. Adicionalmente, el exón 22 tiene 2 sitios alternativos de terminación, por lo que la proteína puede contener los casetes C2 o C2'¹⁰.

La composición de los NMDARs no se conoce con precisión. Se ha demostrado que los receptores formados por 4 subunidades NR1 (homoméricos) son funcionales. Sin embargo, la corriente iónica generada por la activación de los mismos es menor que la generada por la combinación de las subunidades NR1 con subunidades NR2, y que la corriente inducida por la estimulación de los NMDARs *in vivo*, por lo que se propone que los NMDARs son heterómeros que incluyen dos subunidades NR1, que forman el canal, y una o más subunidades NR2 y/o NR3 que modulan su actividad⁷.

Se han descrito 4 subunidades NR2 (NR2a-d) codificadas por genes diferentes. Las propiedades funcionales de los canales del receptor, tales como la afinidad aparente por los agonistas y su sensibilidad a los antagonistas competitivos, así como al bloqueo por Mg⁺⁺, dependen de la variante de NR2 incluida en el heterómero. Consecuentemente, existe una distribución homogénea de la subunidad NR1 tanto en las diversas áreas del SNC como durante el DE, mientras que las subunidades NR2 se distribuyen de manera diferencial en las regiones del cerebro adulto, así como a lo largo del desarrollo del mismo¹. Recientemente, se identificaron dos formas de NR3 (a y b) codificadas por distintos genes. Mientras que NR3a se expresa

en forma generalizada en el SNC, la expresión de NR3b parece estar restringida a las neuronas motoras. A semejanza de NR2, NR3 es una subunidad reguladora, cuya inclusión en los receptores disminuye las corrientes iónicas generadas por la activación de los heterómeros NR1/NR2¹¹. En estudios recientes se observó que la combinación NR1/NR3b forma receptores de glicina excitadores, insensibles al Glu y al NMDA, que se inhiben por D-serina, un co-agonista de los NMDARs convencionales. Debido a su insensibilidad al bloqueo por Mg⁺⁺, se ha propuesto que este tipo de receptores podría intervenir en la activación de las llamadas "sinapsis silenciosas" de NMDA. Respuestas similares a las obtenidas mediante la coexpresión de estas subunidades en sistemas heterólogos, sólo se han identificado en neuronas de la corteza cerebral¹².

La diversidad funcional de los receptores de 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 el proceso de diferenciación de las células que lo forman^{8,10}.

EL GLUTAMATO COMO NEUROTRANSMISOR EXCITADOR EN LA RETINA

La vía principal de neurotransmisión en la retina de los vertebrados está formada por los fotorreceptores, las células bipolares y las ganglionares. Las células bipolares hacen sinapsis con los fotorreceptores en la capa plexiforme externa (OPL) y con las ganglionares en la capa plexiforme interna (IPL). Los axones de las células ganglionares forman el nervio óptico, que transmite los impulsos generados en la retina hacia centros superiores de integración (Figura 2). Tanto los fotorreceptores como las células bipolares liberan Glu como transmisor.

La mayor parte de las neuronas de la retina, a diferencia de neuronas en otras regiones del sistema nervioso, no genera potenciales de acción sino potenciales graduales. Los fotorreceptores tienen un nivel tónico de despolarización, por lo que el Glu se libera continuamente de los mismos en la oscuridad. La luz hiperpolariza a los fotorreceptores y detiene la liberación de Glu, debido al cierre de los canales de sodio involucrados en la fototransducción, por lo que la cinética de la respuesta de las neuronas de segundo (bipolares) y tercer orden (ganglionares) a la estimulación luminosa refleja de manera fiel los cambios en la liberación de Glu de los fotorreceptores. Como consecuencia, la codificación de los estímulos visuales depende tanto de la presencia como de la ausencia de Glu en los espacios sinápticos de la retina.

En el sistema visual, la detección de los contrastes se logra a través de la segregación de los estímulos en dos vías celulares, ON y OFF, a partir de las células bipolares (Figura 3). Las células bipolares ON se despolarizan como respuesta a los estímulos

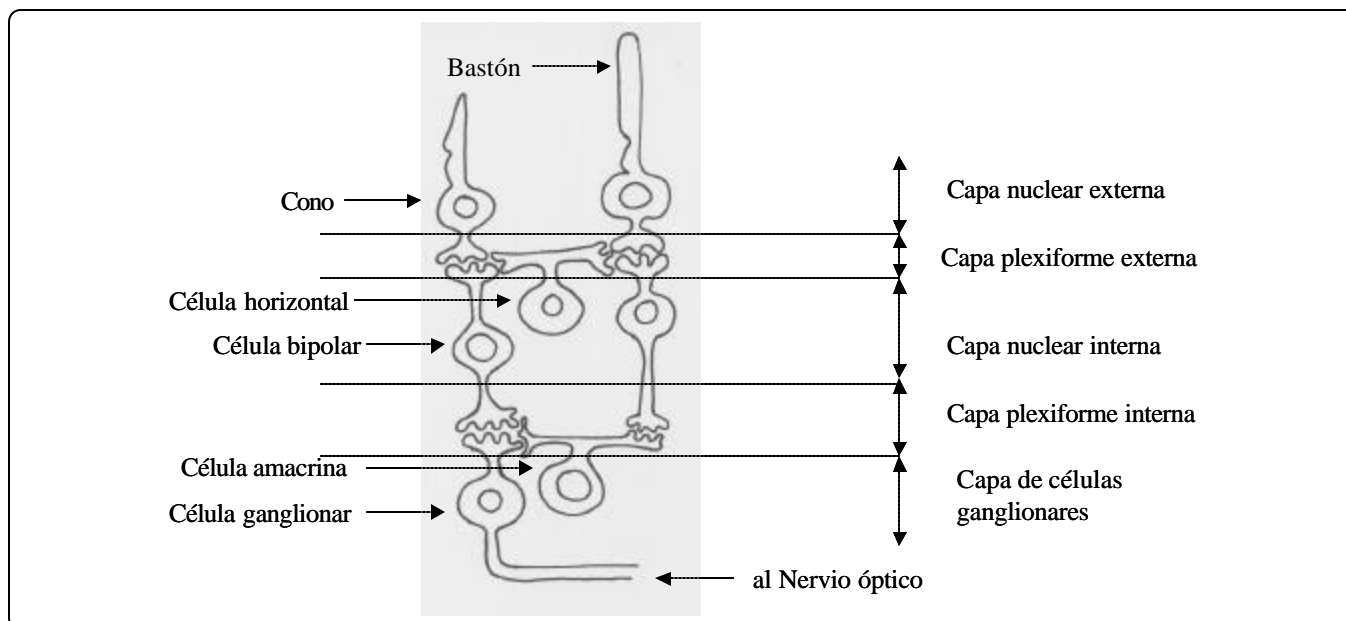


Figura 2. Estructura de la retina. Modificado de Nicholls¹³.

luminosos, en tanto que las bipolares OFF se hiperpolarizan³. Dado que todos los fotorreceptores liberan Glu como neurotransmisor, la respuesta opuesta de las células bipolares ON y OFF al Glu se debe a la presencia de receptores diferentes, acoplados a cascadas enzimáticas intracelulares particulares. Las células bipolares ON poseen receptores de tipo metabotrópico exclusivos de la retina (mGluR6) que, en presencia de Glu (oscuridad), activan a una fosfodiesterasa que hidroliza al GMPc. La disminución de la concentración de GMPc por la actividad de esta enzima produce el cierre de los canales de Na^+ y la hiperpolarización de la célula¹⁴. En contraste, las células bipolares OFF se despolarizan en la oscuridad, debido a que tienen receptores de AMPA/KA en la membrana postsináptica, cuyos canales iónicos, permeables al Na^+ , se activan por el Glu liberado tónicamente por los fotorreceptores en la oscuridad¹⁵. Consecuentemente, la iluminación de la retina despolariza a las células bipolares ON, e hiperpolariza a las bipolares OFF. A diferencia de la mayor parte de los receptores AMPA/KA en el cerebro, los de la retina tienen mayor permeabilidad al Ca^{++} y se desensibilizan más lentamente, lo que permite a estas células responder de manera tónica a la liberación de Glu¹⁶.

Las células ganglionares son un punto de convergencia para la información proveniente de las células bipolares, amacrinas y otras células ganglionares, por lo que expresan una gran variedad de receptores para neurotransmisores, tanto excitadores (como acetilcolina y Glu) como inhibidores (ácido γ -amino butírico (GABA) y Glicina). Los receptores de Glu, principalmente los de tipo AMPA/KA y NMDA, juegan un papel crucial en la fisiología de las células ganglionares, debido a que el influjo de Ca^{++} a través de los mismos interviene en una gran variedad de procesos celulares, y en condiciones patológicas como el glaucoma y la

isquemia, están directamente relacionados con la muerte por excitotoxicidad¹⁷.

LA FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO DE TIPO NMDA

Los receptores de tipo NMDA de la retina, al igual que los de tipo metabotrópico y los de AMPA, difieren significativamente de los descritos en el cerebro. Se ha demostrado que existen diferencias en las características de la interacción de los antagonistas del Glu, como el CPP (ácido 3-((+)-2-carboxipiperazin-4-yl)-propil-1-fosfónico) y el MK-801(+) (maleato de 5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohept-5,10-imina) con el sitio del agonista¹⁸. Asimismo, los antagonistas de la glicina en el sitio del coagonista, como el 7-CK (ácido 7-clorokinurénico) y el ACEA-1021 (5-nitro-6,7-dicloro-1,4-dihidroquinoxalina-2,3-diona) no modifican significativamente la interacción de la glicina con el mismo^{19,20}. Estas diferencias podrían explicar la falta de efecto del 7-CK en la protección de las neuronas de la retina de la muerte por isquemia, como ocurre en otras regiones del SNC²¹. La modulación de los NMDARs por poliaminas en la retina también es diferente al cerebro: se ha observado que en la retina la espermina y la espermidina inhiben la unión de glicina al sitio del coagonista, en tanto que en el cerebro potencian tanto la interacción de la glicina con el mismo, como la estimulación producida por el Glu¹⁹.

Las diferencias bioquímicas y farmacológicas entre los NMDARs de la retina y los del cerebro sugieren que la composición de los receptores heteroméricos podría diferir en ambos tejidos, tanto por la inclusión de la subunidad NR2C, exclusiva de la retina y el cerebelo, como por la expresión diferencial de las variantes por empalme alternativo de la subunidad NR1. Particularmente, las

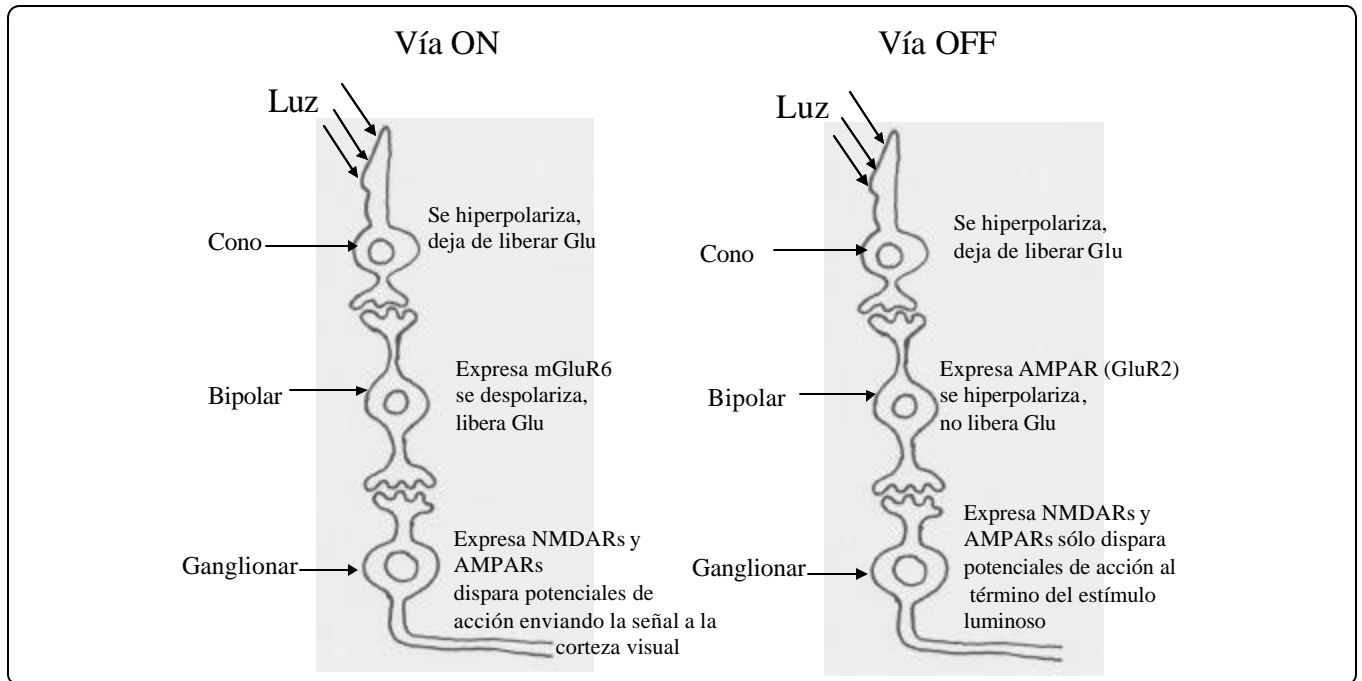


Figura 3. Vías celulares de la neurotransmisión excitadora en la retina. Se ilustra la segregación de las vías ON y OFF que intervienen en la neurotransmisión glutamatergica en presencia de luz. Modificado de Nicholls¹³.

características relacionadas con el efecto de la espermina y la potencia y eficiencia de los antagonistas en la retina, podrían derivar de la expresión predominante de isoformas de NR1 que contienen el casete N1, en contraste con el cerebro, en el que predominan las variantes sin esta región (Figura 4). El casete N1 está constituido por 21 aminoácidos, de los cuales 6 están cargados positivamente²². Se ha propuesto que estos aminoácidos forman un lazo sobre la boca del canal, modificando así sus propiedades. En las isoformas que contienen el casete N1, las poliaminas ni el Zn⁺⁺ potencian la estimulación por Glu²³, posiblemente por su naturaleza catiónica y su repulsión por el casete. También se relacionan con la presencia del casete N1, propiedades como la afinidad de los receptores por los agonistas, y su sensibilidad a los antagonistas APV (ácido D(-)-2-amino-5-fosfonopentanóico), CPP, 7-CK y MK-801, que disminuyen en los receptores que incluyen NR1 con el casete N1 respecto a los que no incluyen el casete N1^{24,25}, lo que contribuye a explicar las características de los NMDARs en la retina.

La subunidad NR1 de los NMDARs de la retina y el cerebro no sólo difiere en el extremo N-terminal. La retina expresa variantes por empalme en el extremo C-terminal de NR1 distintas de las del cerebro²⁶ (Figura 4), cuya expresión se relaciona con la inserción de la subunidad NR1 en la membrana^{27,28}, así como con el agrupamiento de los receptores en cúmulos, en áreas específicas de la membrana plasmática²⁹.

La región C-terminal de NR1 varía ampliamente entre las

especies^{26,30}. El análisis comparativo de la secuencia genómica de la NR1 de mamíferos (rata y humano), aves y peces, demuestra que la secuencia de pollo tiene alto grado de homología con la rata hasta el final del exón 21, que codifica para el casete C1. Este casete se relaciona con la regulación del receptor por la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa A (PKA)^{28,31}; contiene asimismo, un sitio de unión para la calmodulina (CaM), que interviene en la regulación de la inactivación de los receptores³². En la retina, al igual que el cerebro, se expresa la subunidad NR1 que contiene casete C1 pero, a diferencia de éste, en la retina se expresan adicionalmente variantes exclusivas de la retina y el cerebelo de pollo, que contienen un casete C3, descrito recientemente²⁶ (Figura 4B). El casete C3 está codificado en el gen por un exón de 42 pb que no existe en el gen de la rata y codifica para seis aminoácidos (EETSEH). Este casete se inserta a continuación del casete C0 (porción C-terminal que sigue al último segmento transmembranal y precede al casete C1), e incluye una secuencia de fosforilación por la caseína cinasa II (CKII)^{33,34}; Figura 5). Aunque su significado fisiológico se desconoce, se demostró la intervención de la CKII en el mantenimiento de la actividad basal del canal de los NMDARs en el hipocampo³⁵, así como en la regulación de los ritmos circadianos, proceso en el cual está involucrada la retina de las aves³⁶.

Los casetes C2 y C2' intervienen en el transporte, inserción y mantenimiento de la subunidad NR1 en la membrana sináptica. El casete C2' de la NR1 de la rata contiene una secuencia de interacción con dominios PDZ, a través de la cual el receptor NMDA interactúa con proteínas de la densidad postsináptica^{27,37};

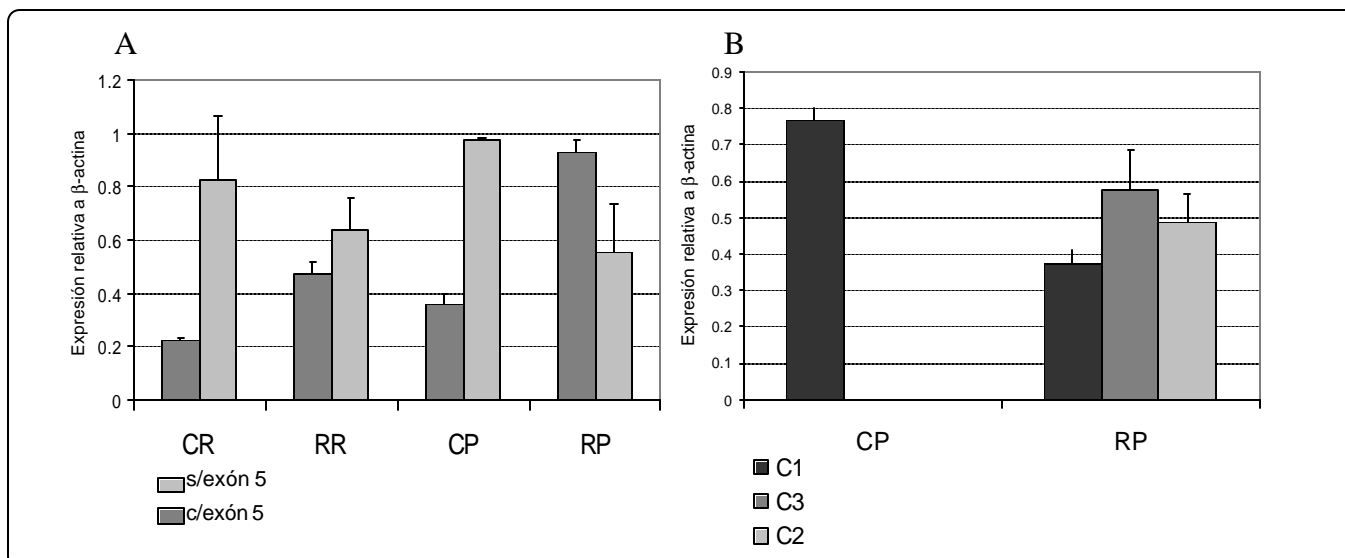


Figura 4. Expresión de las variantes de NR1 en la retina y el cerebro. El perfil de expresión del mRNA de la NR1 se determinó mediante la RT-PCR, usando un juego de "primers" que amplifica desde el exón 4 hasta el exón 6 (Panel A), y desde el exón 19 al exón 22 (Panel B). Los resultados se normalizaron con respecto a la expresión del mRNA para actina. Las gráficas corresponden al análisis densitométrico normalizado de los gels correspondientes (no se muestran). Se muestran resultados representativos de 3 experimentos independientes. CR, cerebro de rata; RR, retina de rata; CP, cerebro de pollo; RP, retina de pollo. Modificado de Lee-Rivera²⁶.

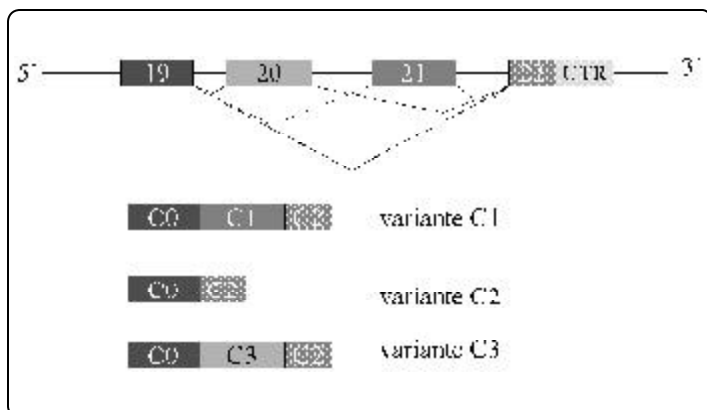


Figura 5. Variantes de la NR1 generadas por empalme alternativo de los exones 20, 21 y 22. Esquema de la región 3' del gen de NR1 de pollo que, al procesarse por empalme alternativo del mRNA, genera 3 variantes del extremo C-terminal: La variante C1 que contiene los casetes C1 y C2, la variante C3 que contiene los casetes C3 y C2, y la variante C2, que contiene únicamente el casete C2.

sin embargo, la NR1 de aves y de peces carece de estos dominios. En las aves, el casete C2 contiene un sitio de N-miristoilación, que podría proveer un mecanismo alternativo de anclaje en la membrana, y tanto C2 como C2' contienen dos secuencias consenso para la fosforilación por PKC. Estas características sugieren que los mecanismos que controlan el número de receptores NMDA en la sinapsis y su variación en condiciones fisiológicas y patológicas difiere ampliamente entre las especies.

La composición heteromérica de los receptores NMDA determina las

propiedades bioquímicas y biofísicas del canal, por lo que la diversidad de las respuestas electrofisiológicas de los NMDARs de las neuronas de la retina interna podría derivar de diferencias en su composición³⁸. Los NMDARs de la retina son poco sensibles al bloqueo por Mg^{++} ³⁹, posiblemente por la inclusión tanto de variantes de NR1 que contienen casete N1 como de la subunidad NR2C en el receptor. Adicionalmente, algunos receptores de las células ganglionares y amacrinas de la retina de roedores contienen subunidades NR3a, cuya presencia en el receptor reduce las corrientes de Ca^{++} inducidas por NMDA⁴⁰. Es importante considerar que en la retina madura, el Glu se libera de manera tónica, por lo que la inclusión en los receptores de subunidades que confieran baja permeabilidad al Ca^{++} , podría constituir un mecanismo protector contra la excitotoxicidad en este tejido.

La composición heteromérica precisa de los NMDARs se desconoce, tanto en la retina como en el cerebro. El análisis de la expresión del mRNA y de la proteína de las subunidades de los NMDARs en los distintos tipos celulares de la retina de los mamíferos utilizando técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica ha generado resultados contradictorios^{4,41-43}. Mediante la hibridación *in situ*, se identificó al mRNA de la subunidad NR1 en todas las neuronas de la capa nuclear interna (INL) y en las células ganglionares (GCL), mientras que la expresión de las subunidades NR2 se localizó en subpoblaciones restringidas de neuronas de la capa plexiforme interna (IPL)⁴⁴. En contraste, utilizando la inmunohistoquímica se

localizó a las subunidades proteicas de los NMDARs tanto en la IPL como en la capa plexiforme externa (OPL). Aun cuando no ha sido posible registrar respuestas de las células bipolares al NMDA en la retina intacta¹⁶, estos estudios identificaron las proteínas NR1, NR2D y NR2C en algunas células bipolares, así como las NR1 y NR2B en las células horizontales⁴³. En la INL, la inmunoreactividad a NR1 se atribuye principalmente a las células amacrinas, en las cuales el tratamiento con antagonistas de los NMDARs abate la respuesta a la luz⁴⁵. Tanto las células amacrinas de tipo "starburst" como células amacrinas gabaérgicas expresan NMDARs, mientras que las del tipo AII no responden al NMDA¹⁶.

FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES NMDA EN LA MADURACIÓN DE LOS CIRCUITOS SINÁPTICOS DE LA RETINA

Una de las teorías más aceptadas acerca del desarrollo del sistema nervioso propone que las conexiones sinápticas que existen en el cerebro adulto son aquellas que sobreviven 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 la liberación presináptica del neurotransmisor, con la activación de receptores en la postsinapsis y la consecuente entrada de Ca^{++} a través del canal. Para ello, tanto la concentración del neurotransmisor en la hendidura sináptica, como la magnitud del influjo de Ca^{++} , resultante de la activación de los receptores, deben estar estrictamente controladas⁴⁶.

Durante el DE, las neuronas reciben un número pequeño de estímulos de baja intensidad, debido a que existe poca sincronía entre los procesos pre- y post-sinápticos. Estos estímulos, sin embargo, deben tener la capacidad de activar a los receptores de las neuronas jóvenes. A medida que se refinan las conexiones sinápticas, se requiere la regulación tanto de la sensibilidad de los receptores a estímulos de mayor intensidad como de su permeabilidad iónica, ya que la despolarización continua o la elevación excesiva de la concentración intracelular de Ca^{++} podría tener un efecto tóxico sobre las neuronas. Lo anterior implica que las propiedades de los receptores en la membrana de las neuronas deben modificarse como consecuencia del estado de maduración de las sinapsis. Esta hipótesis se ha confirmado en numerosas estructuras del SNC, como el colículo superior y la corteza visual, donde las corrientes generadas por la activación de los NMDARs en las neuronas jóvenes son mayores que aquellas generadas en el estado adulto⁴⁷. Existe evidencia, asimismo, de cambios farmacológicos asociados con períodos específicos del desarrollo, como los observados en la sensibilidad al Mg^{++} ⁴⁸ y a la glicina como consecuencia de la maduración del tejido⁴⁹.

Congruente con lo anterior, durante las primeras etapas del DE de la retina se expresan receptores muy sensibles al Glu, con alta permeabilidad al Ca^{++} , que permiten a las neuronas responder a

estímulos débiles y/o lejanos, y consolidar las respuestas postsinápticas. A medida que se establecen y se refinan las conexiones sinápticas, la distancia entre los sitios de liberación del Glu y sus blancos postsinápticos disminuye, y la liberación de Glu se controla mediante procesos retrógrados¹, por lo que deja de ser indispensable la alta sensibilidad al glutamato. Paralelamente, debe reducirse la permeabilidad iónica de los receptores postsinápticos, tanto para permitir la precisión de la neurotransmisión, como para proteger a las neuronas del daño excitotóxico. En concordancia con estos requerimientos, se ha demostrado la modificación de la interacción específica del NMDA y de AMPA/KA con sus receptores durante el DE de la retina. A medida que se diferencia la retina, la unión de agonistas específicos de los receptores de AMPA/KA decrece, en tanto que la unión de ligandos de los receptores de NMDA, así como la del bloqueador MK-801 se incrementa^{50,51}, lo que sugiere que la expresión de los receptores de NMDA aumenta paralelamente a la diferenciación del tejido. En la fase del desarrollo previa a la estratificación (E6 en el pollo, P3 en la rata), se ha detectado la expresión de NR1a (isoforma sin los casetes N1 y C1) y NR2B en la retina (Figura 6). La transfección de estas subunidades en sistemas heterólogos demostró que los heterómeros NR1a/NR2B generan mayor influjo de Ca^{++} (667nA) que los NR1a/NR2A, y se activan por concentraciones bajas de Glu (0.8 μ M)⁵². La inclusión de la subunidad NR1a tanto con NR2B, como con NR2A, forma receptores altamente sensibles al bloqueo por Mg^{++} , por lo que sólo se activan en condiciones despolarizantes; esta característica les permite funcionar como detectores de la actividad sináptica en el desarrollo embrionario⁵³.

El período de estratificación de la retina se caracteriza, principalmente, por la activa proliferación de los neuroblastos⁵⁴. A lo largo del proceso de diferenciación y el establecimiento de las primeras conexiones sinápticas (E13 en el pollo y P9 en la rata), la subunidad NR1 de los NMDARs adquiere paulatinamente sus características diferenciales, como la presencia del casete N1, y del casete C3; asimismo, se inicia tanto la expresión de NR2A como de NR2C, aunque este último en menor proporción que NR2A (Figura 6)^{26,43}. A diferencia de los receptores que contienen NR2B, los que contienen NR2A son poco sensibles al Glu (1.7 μ M), aunque generan corrientes considerables (364 nA), y aquéllos que contienen NR2C son muy poco sensibles al bloqueo por Mg^{++} , por lo que su activación requiere una despolarización menor que aquéllos sensibles al Mg^{++} , cuya activación requiere potenciales superiores a +40mV^{8,52}.

Las primeras corrientes de Ca^{++} intracelular evocadas por el receptor de NMDA, se observan durante el período de estratificación de la retina, aunque los primeros potenciales se registran cuando concluye esta etapa y se forman las primeras sinapsis en la capa plexiforme interna (E17 en el pollo, P19 en la rata)⁵⁵.

Una vez estratificada la retina, se inicia el período crítico de

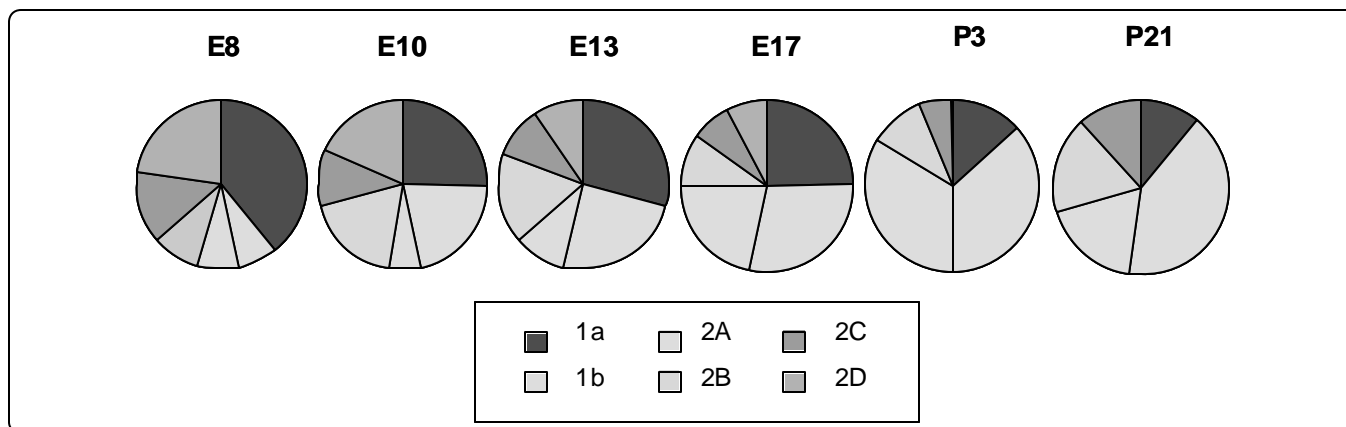


Figura 6. Expresión diferencial de las subunidades del NMDAR en el DE de la retina. El perfil de expresión de las subunidades del receptor se determinó por RT-PCR. Se utilizaron retinas de embriones de 8, 10, 13 y 17 días de DE (E8, E10, E13, E17); retina de pollo de 3 días de nacido (P3) y retina de pollo de 21 días de nacido (P21). Se muestra el análisis densitométrico de los geles, normalizado con respecto a la expresión de actina, haciendo énfasis en la relación proporcional entre las subunidades. Los resultados son representativos de, por lo menos, 3 experimentos independientes.

refinamiento de las conexiones sinápticas. La remodelación dendrítica y la formación de estratos funcionales en la retina de los mamíferos depende de la actividad sináptica y, particularmente, de la activación de los receptores de NMDA⁵⁶. Se ha demostrado que durante este período existe un aumento significativo del número de receptores membranales de NMDA⁵⁰, acompañado del incremento de la afinidad de antagonistas competitivos de los NMDARs, como el APV y el α -aminoadipato, por el sitio de unión del Glu⁵⁷, y de cambios de las propiedades farmacológicas de la interacción de la glicina con el sitio del coagonista del receptor⁵⁸. El sitio de la glicina se localiza en la NR1, y el sitio del agonista y los antagonistas competitivos se forma por la interacción entre subunidades NR2, por lo que la modificación funcional de los NMDARs durante el DE se lleva a cabo a través del recambio de las subunidades NR2 y de las variantes de empalme de NR1 que se incluyen en el receptor.

La muerte celular programada (apoptosis) mediada por los receptores de NMDA juega un papel importante en la remodelación de las conexiones sinápticas en la retina⁵⁹. Durante este período, los NMDARs incluyen variantes por empalme de la subunidad NR1 que contienen casete N1 y casete C1, así como las subunidades NR2A y NR2C^{26,43}, por lo que sus características farmacológicas son muy similares a las que exhibe la retina diferenciada. Es probable, sin embargo, que los mecanismos de regulación funcional de los receptores por reacciones de fosforilación e inserción en la membrana difieran de los observados en la retina madura, ya que predomina la expresión de la subunidad NR1 que contiene el casete C1, involucrado en la agrupación de los receptores en la membrana, su interacción con neurofilamentos del citoesqueleto y su potenciación por la PKC, a diferencia de la retina madura. El establecimiento de los circuitos sinápticos en la retina requiere de la consolidación de los contactos sinápticos y de las relaciones estructurales entre los receptores membranales y las moléculas transductoras de

señales, en congruencia con la expresión mayoritaria de isoformas que contienen C1 durante este período.

Se ha demostrado que el refinamiento de las conexiones sinápticas en la retina entre E13 y P3, caracterizado por la generación de ondas de actividad independientes de la luz, así como por la eliminación natural de neuronas en el sistema visual, requiere del incremento de la concentración intracelular de calcio mediado por los receptores NMDA y no-NMDA^{54,59,60}. La expresión restringida de la variante de NR1 con casete C3 durante este período, sugiere que podría relacionarse con el proceso; la confirmación de esta posibilidad requiere la caracterización funcional de los NMDARs que contienen esta variante en el futuro.

Concluida la estratificación de la retina, se inicia la formación de las sinapsis entre las células bipolares y los fotorreceptores en la capa plexiforme externa (OPL) (E16 en el pollo y P9 en la rata)⁵⁴. Durante este proceso predomina la expresión de NR2B en la OPL, en la que las sinapsis están en consolidación, y la de NR2A en la capa plexiforme interna (IPL), cuyas sinapsis están en proceso de refinamiento. La inclusión de NR2A en los NMDARs de la IPL es consecuencia de la disminución en los requerimientos de sensibilidad a los agonistas y la necesidad de disminuir el influjo de Ca^{++} , para incrementar la precisión de la neurotransmisión.

Algunas de las características bioquímicas de los NMDAR de la retina, como su afinidad por los agonistas, podrían derivar de la inclusión de la subunidad NR2C^{2,8}, dado que su expresión es casi exclusiva de la retina y el cerebelo^{43,61}.

En las células ganglionares se expresan, además de NR2C, NR2A y NR2B, lo que sugiere que los NMDARs podrían estar conformados por 2, o incluso 3 tipos de subunidad, de acuerdo con la amplia diversidad funcional identificada en estas células.

Las células ganglionares son responsables de la integración de la información procedente de las distintas vías ON, OFF y ON/OFF, por lo que las variaciones en la corriente de Ca^{++} inducida por NMDARs de composición heteromérica específica podría intervenir en la segregación de las vías en los distintos subtipos de células ganglionares.

En la retina de pollo, al igual que en el cerebro de rata, NR2D se expresa transitoriamente durante el DE temprano⁶². Como se observa en la Figura 6, la expresión de NR2D decrece al iniciarse la estratificación (E13), posiblemente como consecuencia del aumento de la actividad sináptica, ya que los receptores con NR2D tienen muy alta afinidad por el Glu, son poco sensibles al bloqueo por Mg^{++} y se inactivan con lentitud⁶³. Cuando las conexiones sinápticas se refinan, la entrada de Ca^{++} a través de los NMDARs debe restringirse, por lo que la inclusión de NR2D en los receptores sinápticos podría generar daño excitotóxico por Glu. Debido a que la expresión de NR2D se limita a la parte externa de la IPL y a algunas células ganglionares, y a su inmunodetección en las células bipolares que se conectan con bastones en la retina de conejo⁶⁴, se ha sugerido que esta subunidad podría estar involucrada en la consolidación de la vía de transmisión de los bastones⁴³. Sin embargo, el papel de los NMDARs en esta vía no está claro, ya que las células bipolares de bastones son de tipo ON y su respuesta a la luz está mediada por mGluR6¹⁶.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La heterogeneidad de los receptores sinápticos de glutamato en la retina es un factor clave para la generación de las propiedades funcionales específicas de las neuronas en este tejido. La activación de los NMDARs es esencial, tanto para el establecimiento de las conexiones sinápticas, como para la codificación de estímulos y su transmisión hasta el cerebro. Los NMDARs juegan un papel muy importante en el procesamiento de la información necesaria para el desarrollo del sistema visual y están involucrados, asimismo, en la muerte por excitotoxicidad característica de padecimientos como el glaucoma, la oclusión vascular, la neuropatía óptica y la isquemia.

El estudio de los NMDARs de la retina ha demostrado que sus propiedades cinéticas y farmacológicas difieren de las descritas en el cerebro, tanto en el tejido diferenciado como durante el DE⁵⁰. Estas diferencias tienen importante repercusión en la clínica, ya que los NMDARs de la retina no responden a los antagonistas del Glu, como el 7CK, el CPP y el MK-801(+), empleados para la protección de las neuronas del cerebro contra la muerte por excitotoxicidad^{18,51}. Por lo tanto, la determinación de la composición oligomérica de los NMDARs en los distintos tipos celulares, así como la exploración de los circuitos glutamatérgicos de la retina reviste particular importancia en el futuro.

El 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 subyacen la plasticidad tanto durante el DE, como en el SN diferenciado, requiere un modelo animal adecuado para su estudio. La retina del pollo representa un excelente modelo para este propósito, ya que expresa de manera orquestada todas las isoformas de NR1 y todas las subunidades de tipo NR2 a lo largo del DE.

REFERENCIAS

1. Michaelis, E.K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* **54**, 369-415 (1998).
2. López-Colomé, A.M. in *Excitatory amino acids* (eds. Roberts, P.J., Storm-Mathisen, J. & H.F. Bradford) 143-157 (McMillan Press, London, 1986).
3. Massey, S. & Maguire, G. in *Excitatory amino acids and synaptic transmission* (eds. Wheal, H. & AM, T.) 201-221 (Academic Press, New York, 1995).
4. Fletcher, E.L., Hack, I., Brandstatter, J.H. & Wassle, H. Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* **420**, 98-112 (2000).
5. Alagarsamy, S., Sorensen, S. & Conn, P. Coordinate regulation of metabotropic glutamate receptors. *Curr. Op. Neurobiol.* **11**, 357-362 (2001).
6. Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. & Traynelis, S.F. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* **51**, 7-61 (1999).
7. Moriyoshi, K. *et al.* Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* **354**, 31-37 (1991).
8. Kutsuwada, T. *et al.* Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* **358**, 36-41 (1992).
9. Ciabarra, A.M. *et al.* Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J. Neurosci.* **15**, 6498-6508 (1995).
10. Monyer, H. *et al.* Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* **256**, 1217-1221 (1992).
11. Das, S. *et al.* Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* **393**, 377-381 (1998).
12. Chatterton, J. *et al.* Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* **415**, 793-798 (2002).
13. Nicholls, J.G. *et al.* From Neuron to Brain (Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA, 2001).
14. Barnstable, C.J. Glutamate and GABA in retinal circuitry. *EXS* **66**, 121-133 (1993).
15. DeVries, S.H. Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. *Neuron* **28**, 843-856 (2000).
16. Thoreson, W.B. & Witkovsky, P. Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Progress in Retinal & Eye Research* **18**, 765-810 (1999).
17. Sucher, N.J., Lipton, S.A. & Dreyer, E.B. Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res.* **37**, 3483-3493 (1997).
18. López-Colomé, A.M. & Somohano, F. N-methyl-D-aspartate receptors in the retina: 3-[(+/-)-2- carboxypiperazin- 4-yl]-propyl-1-phosphonic acid (CPP) binding studies.

- Neuropharmacology* **31**, 577-584 (1992).
19. Calderón, F. & López-Colomé, A.M. Spermine inhibits [3H]glycine binding at the NMDA receptors from plexiform layers of chick retina. *Neurochem. Res.* **23**, 1363-1369 (1998).
 20. Rodríguez-Contreras, A., Calderón, F. & López-Colomé, A.M. Strychnine-insensitive [3H] glycine binding to synaptosomal membranes from the chick retina. *Int. J. Dev. Neurosci.* **16**, 413-421 (1998).
 21. Lombardi, G. & Moroni, F. Glutamate receptor antagonists protect against ischemia-induced retinal damage. *Eur. J. Pharmacol.* **271**, 489-495 (1994).
 22. Zukin, R.S. & Bennett, M.V. Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci.* **18**, 306-313 (1995).
 23. Traynelis, S.F., Hartley, M. & Heinemann, S.F. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* **268**, 873-876 (1995).
 24. Durand, G.M., Bennett, M.V. & Zukin, R.S. 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 (1993).
 25. Hollmann, M. *et al.* Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron* **10**, 943-954 (1993).
 26. Lee-Rivera, I., Zarain-Herzberg, A. & López-Colomé, A.M. Developmental expression of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor 1 splice variants in the chick retina. *J. Neurosci. Res.* **73**, 369-383 (2003).
 27. Standley, S., Roche, K.W., McCallum, J., Sans, N. & Wenthold, R.J. PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* **28**, 887-898 (2000).
 28. Tingley, W. *et al.* 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 (1997).
 29. Okabe, S., Miwa, A. & Okado, H. Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. *J. Neurosci.* **19**, 7781-7792 (1999).
 30. Bottai, D., Maler, L. & Dunn, R.J. Alternative RNA splicing of the NMDA receptor NR1 mRNA in the neurons of the teleost electrosensory system. *J. Neurosci.* **18**, 5191-5202 (1998).
 31. Tingley, W.G., Roche, K.W., Thompson, A.K. & Huganir, R.L. Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature* **364**, 70-73 (1993).
 32. Ehlers, M.D., Zhang, S., Bernhardt, J.P. & Huganir, R.L. Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* **84**, 745-755 (1996).
 33. Meggio, F., Marin, O. & Pinna, L.A. Substrate specificity of protein kinase CK2. *Cell Mol. Biol. Res.* **40**, 401-409 (1994).
 34. Kuenzel, E.A., Mulligan, J.A., Sommercorn, J. & Krebs, E.G. Substrate specificity determinants for casein kinase II as deduced from studies with synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* **262**, 9136-9140 (1987).
 35. Lieberman, D.N. & Mody, I. Casein kinase-II regulates NMDA channel function in hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.* **2**, 125-132 (1999).
 36. Whitmore, D. *et al.* A clockwork organ. *Biol. Chem.* **381**, 793-800 (2000).
 37. Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B. & Seeburg, P.H. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* **269**, 1737-1740 (1995).
 38. Sun, D., Rait, J.L., Kalloniatis, M. & Margalit, E. Inner retinal neurons display differential responses to N-methyl-D-aspartate receptor activation Stargardt disease in a patient with retinoblastoma. *Journal of Comparative Neurology* **465**, 38-56 (2003).
 39. Lelong, I.H. *et al.* Pharmacological properties of N-methyl-D-aspartate receptors on ganglion cells of an amphibian retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 8472-8476 (1992).
 40. Sucher, N.J. *et al.* N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR3A in the retina: developmental expression, cellular localization, and functional aspects. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **44**, 4451-4456 (2003).
 41. Brandstätter, J.H., Hartveit, E., Sassoe-Pognetto, M. & Wässle, H. Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur. J. Neurosci.* **6**, 1100-1112 (1994).
 42. Watanabe, M., Mishina, M. & Inoue, Y. Differential distributions of the NMDA receptor channel subunit mRNAs in the mouse retina. *Brain Res.* **634**, 328-332 (1994).
 43. Gründer, T., Kohler, K., Kaletta, A. & Guenther, E. The distribution and developmental regulation of NMDA receptor subunit proteins in the outer and inner retina of the rat. *J. Neurobiol.* **44**, 333-342 (2000).
 44. Brandstätter, J.H., Koulen, P. & Wässle, H. Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Res.* **38**, 1385-1397 (1998).
 45. Dixon, D.B. & Copenhagen, D.R. Two types of glutamate receptors differentially excite amacrine cells in the tiger salamander retina. *Journal of Physiology* **449**, 589-606 (1992).
 46. Scheetz, A.J. & Constantine-Paton, M. Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neural development. *FASEB Journal* **8**, 745-752 (1994).
 47. Hestrin, S. Developmental regulation of NMDA receptor-mediated synaptic currents at a central synapse. *Nature* **357**, 686-689 (1992).
 48. Morrisett, R., Mott, D., Lewis, D., Wilson, W. & Swartzwelder, H. 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**, 257-262 (1990).
 49. Kleckner, N. & Dingledine, R. Regulation of hippocampal NMDA receptors by magnesium and glycine during development. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **11**, 151-159 (1991).
 50. Somohano, F., Roberts, P.J. & López-Colomé, A.M. Maturation changes in retinal excitatory amino acid receptors. *Brain Res.* **470**, 59-67 (1988).
 51. Subramaniam, S. & McGonigle, P. Regional profile of developmental changes in the sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines. *J. Neurochem.* **62**, 1408-1415 (1994).
 52. Yamakura, T. & Shimoji, K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog. Neurobiol.* **59**, 279-298 (1999).
 53. Cull-Candy, S., Brickley, S. & Farrant, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology* **11**, 327-335 (2001).
 54. Mey, J. & Thanos, S. Development of the visual system of the chick.

- I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **32**, 343-379 (2000).
55. Sugioka, M., Fukuda, Y. & Yamashita, M. Development of glutamate-induced intracellular Ca²⁺ rise in the embryonic chick retina. *J. Neurobiol.* **34**, 113-125 (1998).
56. Goodman, C. & Shatz, C. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* **72** Supp, 77-98 (1993).
57. López-Colomé, A.M. & Somohano, F. in *Extracellular and intracellular messengers in the vertebrate retina*. (eds. Redburn, D. & Pasantés-Morales, H.) (Alan Liss Inc., New York, NY, 1989).
58. Boje, K.M., Skolnick, P., Raber, J., Fletcher, R.T. & Chader, G. Strychnine-insensitive glycine receptors in embryonic chick retina: characteristics and modulation of NMDA neurotoxicity. *Neurochem. Int.* **20**, 473-486 (1992).
59. Clarke, P.G. Neuron death in the developing avian isthmo-optic nucleus, and its relation to the establishment of functional circuitry. *J. Neurobiol.* **23**, 1140-1158 (1992).
60. Wong, R.O. Retinal waves and visual system development. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 29-47 (1999).
61. Prybylowski, K.L. & Wolfe, B.B. Developmental differences in alternative splicing of the NR1 protein in rat cortex and cerebellum. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **123**, 143-150 (2000).
62. Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B. & Seeburg, P.H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **12**, 529-540 (1994).
63. Vicini, S. *et al.* Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurophysiol.* **79**, 555-566 (1998).
64. Wenzel, A., Benke, D., Mohler, H. & Fritschy, J.M. N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2D subunit in the retina are selectively expressed in rod bipolar cells. *Neuroscience* **78**, 1105-1112 (1997).