

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la proteína HINT1: actividad SUMO proteasa,
regulación de canales TRPs e implicación en el síndrome
bipolar y la actividad motora**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Elsa Cortés Montero

DIRECTORES

Javier Garzón Niño
María Rodríguez Muñoz

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LA PROTEÍNA HINT1: ACTIVIDAD SUMO PROTEASA, REGULACIÓN
DE CANALES TRPs E IMPLICACIÓN EN EL SÍNDROME BIPOLAR Y LA ACTIVIDAD
MOTORA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elsa Cortés Montero

DIRECTOR

Javier Garzón Niño
María Rodríguez Muñoz

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología y Toxicología



**ESTUDIO DE LA PROTEÍNA HINT1: ACTIVIDAD SUMO
PROTEASA, REGULACIÓN DE CANALES TRP_s E IMPLICACIÓN
EN EL SÍNDROME BIPOLAR Y LA ACTIVIDAD MOTORA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA
POR**

Elsa Cortés Montero

Directores

Javier Garzón Niño

María Rodríguez Muñoz

Madrid, 2021

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada con la ayuda económica de un contrato de investigación predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU), concedida por el Ministerio de Universidades durante los años 2017-2021.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo agradecer al Dr. Garzón y a la Dra. Sánchez Blázquez la oportunidad de unirme a su grupo de investigación y de realizar esta Tesis Doctoral. Gracias por vuestros consejos y ayuda durante estos años. Igualmente importante es la Dra. María Rodríguez, codirectora de la Tesis y, sobre todo, amiga y compañera. Has sido tú quién me ha enseñado todo en el laboratorio desde el primer día, cuando no sabía ni coger una pipeta. Agradecer también al Dr. Leza su inestimable colaboración como tutor en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la UCM.

Gracias a todas mis compañeras del laboratorio de Neurofarmacología: Gabriela, María José, Verónica y Aída, con las que he compartido esta experiencia. Juntas hemos vivido los días buenos y los malos, cuando teníamos resultados interesantes y cuando había que repetir la purificación de las proteínas; en general, la vida del laboratorio. Me habéis hecho reír y me habéis apoyado cuando los ánimos me abandonaban. Esta etapa se acaba, pero espero que sigamos viéndonos para contarnos nuestras novedades. Gracias también a Yara porque, aunque nos conocimos en el laboratorio, nuestra amistad ha perdurado incluso en sitios tan fríos como Suecia.

No me puedo olvidar de mis amigos de Getafe, los que siempre han tirado de mí para salir, desconectar y disfrutar. Habéis estado ahí, animándome, preguntándome por los avances de la Tesis, aunque cuando intentaba explicarme, no con mucho éxito, me poníais cara de póquer.

Gracias a mi hermana Sara y a Iván, ese pequeño granujilla que siempre te saca una sonrisa aún en los días más grises. Hemos pasado una temporada mala, pero todo se arregla, y siempre se sale del hoyo. Para eso estamos las hermanas. Y si no, Iván te da uno de sus súper abrazos que te reconcilian con la vida.

A Néstor, la persona que ha estado a mi lado los últimos doce años. Gracias por estar siempre presente, apoyándome y animándome todos los días, aunque muchas veces no haya sido fácil. Ahora empezamos una nueva etapa, un nuevo reto, que espero superemos juntos.

Y finalmente quisiera dar las gracias de corazón a mis padres, que desde pequeña me han enseñado el valor de la constancia y la perseverancia, que tan importante es en la investigación. Gracias por estar siempre dispuestos a escuchar mis progresos y dificultades. Éste también es vuestro premio.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	5
I. INTRODUCCIÓN.....	7
1. Superfamilia HIT	9
2. Familia HINT	11
2.1. HINT1.....	11
2.1.1. Actividad enzimática.....	13
2.1.2. Asociación con factores de transcripción.....	14
2.2. HINT2 y HINT3.....	17
2.3. Patologías asociadas a las proteínas HINT.....	18
2.3.1. Cáncer.....	18
2.3.2. Trastornos motores.....	19
2.3.3. Trastornos psiquiátricos.....	21
3. Señalización de la HINT1 en la membrana plasmática	23
3.1. Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).....	24
3.1.1. Receptor opioide Mu (MOR).....	28
3.1.1.1. Efectos farmacológicos de la activación del MOR.....	29
3.1.1.2. Señalización del MOR.....	31
3.1.1.3. Mecanismos de regulación de la señalización opioide: desensibilización y tolerancia.....	32
3.2. Receptores NMDA.....	34
3.2.1. Estructura.....	34
3.2.2. Activación y desactivación del receptor.....	37
3.2.3. Distribución y localización anatómica.....	38
3.2.4. Patologías asociadas al NMDAR.....	39
3.3. Receptores TRPs.....	41
3.3.1. TRPV1.....	43
3.3.2. TRPA1.....	47
3.3.3. TRPM8.....	51
3.4. Regulación cruzada entre GPCRs y canales iónicos.....	53
II. OBJETIVOS.....	59

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
1. Materiales	67
1.1. Animales de experimentación.....	67
1.1.1. Genotipado de ratones 129/SvJ.....	67
1.2. Anticuerpos.....	68
1.3. Proteínas recombinantes.....	70
1.3.1. Proteínas recombinantes comerciales.....	70
1.3.2. Proteínas producidas en el laboratorio: diseño y síntesis de <i>primers</i>	70
1.4. Drogas, compuestos e iones metálicos.....	73
2. Métodos	74
2.1. Administración intracerebroventricular (icv), intraperitoneal (ip) e intraplantar (ipl).....	74
2.2. Test de comportamiento.....	74
2.2.1. Estudio de la actividad motora espontánea: test de campo abierto.....	75
2.2.2. Test de actividad en rodillo: rotarod.....	75
2.2.3. Test del residente-intruso.....	76
2.2.4. Test de preferencia de soluciones azucaradas.....	76
2.2.5. Test de natación forzada.....	76
2.3. Modelo de dolor neuropático: lesión por constricción crónica del nervio ciático (CCI).....	77
2.4. Ensayos de inmunoprecipitación.....	77
2.4.1. Obtención y preparación de las muestras.....	77
2.4.2. Inmunoprecipitación de proteínas.....	78
2.5. Electroforesis de proteínas y transferencia a soporte sólido: detección inmunológica (<i>western blot</i>).....	79
2.6. Análisis estadístico.....	81
2.7. Producción de proteínas recombinantes.....	81
2.7.1. Obtención del ADN complementario como molde para PCR.....	81
2.7.2. Clonaje.....	82
2.7.3. Transformación y análisis de clones.....	84
2.7.4. Expresión.....	84
2.7.5. Purificación.....	85
2.7.6. Corte proteolítico con la proteasa TEV.....	85
2.7.7. Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución.....	86
2.8. Ensayos de interacción <i>in vitro</i> de proteínas recombinantes (<i>pull-down</i>).....	87
2.9. Ensayos <i>in vitro</i> de sumoilación y desumoilación.....	88

IV. RESULTADOS	91
1. Animales HINT1^{-/-} como modelo del síndrome bipolar humano	93
1.1. Caracterización fenotípica de animales HINT1 ^{-/-} en los test de valoración de la conducta maniaca	95
1.2. Efecto de diferentes fármacos sobre la conducta de animales “maniacos”	100
1.3. Los antagonistas del σ 1R modulan el comportamiento de ratones “maniacos”	102
1.4. El antagonismo del NMDAR abole la conducta “depresiva” en ratones	104
1.5. El estrés promueve conductas “depresivas” en ratones KO de la HINT1	106
1.6. Alteraciones moleculares observadas en ratones HINT1 ^{-/-} y BStac	108
1.7. Efecto de la inhibición de la PKC sobre la enzima GSK3 β en ratones HINT1 ^{-/-}	111
2. Actividad SUMO proteasa de la HINT1	112
2.1. Unión de la HINT1 al SUMO1 y la CaM	112
2.2. La HINT1 posee actividad SUMO proteasa	115
2.3. Actividad SUMO proteasa de la HINT1 sobre diferentes sustratos	118
2.4. Efecto de TpGc y TpAd sobre la actividad SUMO proteasa de la HINT1	121
2.5. Los iones metálicos divalentes alteran la actividad SUMO proteasa de la HINT1	122
2.6. Identificación del centro catalítico de la HINT1	126
2.7. Regulación de la actividad SUMO proteasa de la HINT1 por proteínas de señalización	129
2.8. Regulación <i>in vivo</i> de la actividad SUMO proteasa de la HINT1	130
3. Caracterización molecular de los mutantes de la HINT1 causantes de la ARAN-NM	133
3.1. Localización en la secuencia de la HINT1 de las mutaciones que causan la ARAN-NM	133
3.2. Alteración de la actividad SUMO proteasa en los mutantes de la HINT1 relacionados con la ARAN-NM	134
3.3. Unión al SUMO1 y a la CaM de los mutantes de la HINT1 causantes de la ARAN-NM	136
3.4. Unión a la NR1 y al MOR de los mutantes humanos de la HINT1	138
3.5. Unión a la RGSZ2 y al ICD de la teneurina 1 de los mutantes de la HINT1 causantes de la ARAN-NM	140
3.6. Unión al σ 1R de los mutantes de la HINT1 causantes de la ARAN-NM	141
4. Unión de HINT1, σ1R y CaM a las regiones citosólicas de los TRPs	142
4.1. Interacciones del TRPV1	142
4.2. Interacciones del TRPA1	144

4.3. Interacciones del TRPM8.....	146
4.4. Efecto de los ligandos del σ 1R en sus interacciones con los TRPs seleccionados.....	148
5. Asociación del TRPA1 con el MOR y el NMDAR: papel de la CaM.....	150
5.1. Asociación del TRPA1 con el MOR y la subunidad NR1 del NMDAR en diferentes estructuras del SN: efecto de intervenciones farmacológicas.....	150
5.2. El dolor inflamatorio y el neuropático alteran la asociación del TRPA1 con el MOR y el NMDAR.....	153
5.3. La CaM media la interacción del canal TRPA1 con el MOR y la subunidad NR1 del NMDAR.....	156
V. DISCUSIÓN.....	159
1. Animales KO de la HINT1 como modelo del síndrome bipolar humano.....	163
2. Actividad SUMO proteasa de la HINT1.....	173
3. Caracterización de los mutantes de la HINT1 causantes de la ARAN-NM.....	180
4. Asociaciones de las regiones citosólicas de los TRPs.....	184
5. Asociación del TRPA1 con el MOR y el NMDAR: papel de la CaM.....	189
VI. CONCLUSIONES.....	195
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	201
VIII. PUBLICACIONES.....	249

RESUMEN

Estudio de la proteína HINT1: actividad SUMO proteasa, regulación de canales TRPs e implicación en el síndrome bipolar y la actividad motora

La proteína HINT1 (*histidine triad nucleotide-binding protein 1*), muy conservada en la filogenia, pertenece a la familia HIT, que se caracteriza por poseer una triada de histidinas que, en varios de sus miembros, está implicada en una actividad hidrolasa aunque, en el caso concreto de la HINT1 se desconocen sus sustratos fisiológicos. A nivel clínico, esta proteína se ha asociado con diversas patologías, particularmente con trastornos psiquiátricos, como la esquizofrenia y el trastorno bipolar, y motores, como la neuropatía axonal recesiva autosómica con neuromiotonía (ARAN-NM), en cuyos pacientes se han descrito 15 mutaciones puntuales recesivas de la HINT1 causantes de esta enfermedad. A nivel celular, la HINT1 se encuentra en membrana plasmática, núcleo y citosol. En la membrana plasmática, la HINT1 actúa como proteína de ensamblaje y/o chaperona interaccionando con una amplia variedad de proteínas de señalización, entre los que cabe destacar los reguladores de la señalización de las proteínas G (RGS) y los receptores de glutamato NMDA, además de ser esencial en la regulación funcional de varios receptores acoplados a proteínas G. En el núcleo, la HINT1 juega un papel importante como represor transcripcional asociándose con diferentes factores de transcripción, como el complejo Pontin/Reptin y el dominio intracelular (ICD) de la teneurina 1. Además, la HINT1 es una proteína supresora de tumores ya que participa en la respuesta al daño del ADN, promueve la apoptosis e inhibe la proliferación de células en diversos cánceres.

En el presente estudio hemos profundizado en algunos aspectos de la fisiología de la proteína HINT1. Así, mediante pruebas conductuales se ha observado que los ratones carentes de esta proteína desarrollan un fenotipo bipolar. Estos animales manifiestan de forma espontánea un comportamiento “maniaco” que, en respuesta a situaciones estresantes, vira hacia conductas de tipo depresivo. En este sentido, fármacos que se emplean en el tratamiento del trastorno bipolar normalizan la conducta de los ratones HINT1^{-/-}. Además, nuestro estudio muestra que los ligandos del receptor sigma 1 ($\sigma 1R$) se comportan como fármacos antimaniacos, normalizando esta conducta en los ratones deficientes de la HINT1 sin alterar la de los animales control. A nivel molecular, estos animales muestran una serie de diferencias relacionadas con las descritas en humanos con síndrome bipolar. Así, los ratones HINT1^{-/-} tienen alterada la regulación de la quinasa GSK3 β , la PKC se encuentra más activa y los receptores de glutamato tipo NMDA están

enriquecidos en subunidades NR2B. Un hallazgo particularmente interesante es el descubrimiento de que la HINT1 es una SUMO proteasa y que la tríada Cys84-Asp87-His114 constituye su núcleo catalítico. Esta actividad le permite eliminar el SUMO tanto de proteínas con las que se asocia, como la RGSZ2, o el ICD de la teneurina 1, como de proteínas con las que no establece complejos, como la RanGAP1. Otro aspecto novedoso es que la HINT1 es la primera SUMO proteasa descrita cuya actividad está regulada por iones zinc, calcio-calmodulina (Ca^{2+} -CaM) y procesos redox. Es de destacar que los mutantes humanos de la HINT1 responsables de la ARAN-NM muestran una actividad SUMO proteasa alterada, abolida en la mayoría de ellos y presente, aunque desregulada, en unos pocos. Además, con excepciones puntuales, estos mutantes de la HINT1 apenas establecen asociaciones con proteínas de señalización como la CaM, el SUMO, los receptores de membrana opioide Mu (MOR), NMDA y σ 1R, además de con la RGSZ2 y el ICD de la teneurina 1.

Asimismo, hemos descrito que la HINT1, el σ 1R y la CaM interaccionan con los dominios amino y carboxilo terminales de varios receptores de tipo TRP. Cada región citosólica analizada muestra un patrón específico en la unión y competencia entre estas proteínas de señalización. De forma similar, la actividad de los ligandos del σ 1R viene condicionada por la región citosólica TRP a la que se une el receptor "agonist bias". Por otra parte, hemos caracterizado la asociación del TRPA1 con los receptores MOR y NMDA en varias estructuras del sistema nervioso. La presencia de los complejos TRPA1-MOR y TRPA1-NMDAR se modifica en respuesta a diferentes tratamientos farmacológicos y en modelos de dolor inflamatorio y neuropático. La CaM es esencial en estas asociaciones, promoviendo el acoplamiento del TRPA1 con el MOR y la subunidad NR1 del NMDAR.

Los resultados de esta Tesis Doctoral han demostrado que los ratones carentes de la HINT1 cumplen los requisitos para ser utilizados como un modelo animal para el estudio de posibles fármacos o la identificación de nuevas dianas terapéuticas del trastorno bipolar humano. A nivel molecular, hemos descrito la actividad SUMO proteasa de la HINT1, que está alterada en los mutantes causantes de la ARAN-NM, así como sus interacciones con diferentes proteínas de señalización. Nuestra conclusión es que el bloqueo temprano de la expresión de estos mutantes debería reducir sustancialmente la progresión del deterioro motor en los individuos afectados por estas mutaciones. Por tanto, este estudio aporta nuevos aspectos a la función de la HINT1 en el sistema nervioso, con especial relevancia en su papel en conductas maníacas, trastorno bipolar y la ARAN-NM.

ABSTRACT

Study of HINT1 protein: SUMO protease activity, regulation of TRPs channels and involvement in the bipolar disorder and the motor activity

The phylogenetically highly conserved histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) belongs to the HIT family, which is characterized by a histidine triad involved in hydrolase activity in several of its members, although the physiological substrates of HINT1 are unknown. At the clinical level, HINT1 has been related to various pathologies, especially with psychiatric disorders, such as schizophrenia and bipolar disorder, and motor disorders, such as autosomal recessive axonal neuropathy with neuromyotonia (ARAN-NM), in whose patients 15 recessive point mutations of HINT1 have been described causing this disease. At the cellular level, HINT1 is found in the plasma membrane, nucleus, and cytosol. At the plasma membrane, HINT1 acts as an assembly and/or chaperone protein interacting with a wide variety of signaling proteins, including regulators of G protein signaling (RGS) and NMDA glutamate receptors, as well as being essential in the functional regulation of several G protein-coupled receptors. In the nucleus, HINT1 plays an important role as a transcriptional repressor by associating with different transcription factors, such as the Pontin/Reptin complex and the intracellular domain (ICD) of teneurin 1. In addition, HINT1 is considered a tumor suppressor protein as it participates in the DNA damage response, promotes apoptosis and inhibits cell proliferation in various cancers.

In the present study we have delved into some aspects of the physiology of the HINT1 protein. Thus, behavioral tests have shown that mice lacking this protein develop a bipolar phenotype. These animals spontaneously exhibit "manic" behaviors which, in response to stressful situations, turn to depressive-like behaviors. In this sense, the drugs used in the treatment of bipolar disorder normalize the behavior of HINT1^{-/-} mice. Furthermore, our study shows that sigma 1 receptor ligands (σ 1R) behave as antimanic drugs, normalizing this behavior in HINT1-deficient mice without altering that of control animals. At the molecular level, these animals show a number of differences related to those described in humans with bipolar syndrome. Thus, HINT1^{-/-} mice have altered regulation of GSK3 β kinase, PKC is more active, and NMDA-type glutamate receptors are enriched in NR2B subunits.

A particularly interesting finding is the discovery that HINT1 is a SUMO protease and that the Cys84-Asp87-His114 triad constitutes its catalytic core. This activity allows

HINT1 to remove SUMO both from proteins with which it associates, such as RGSZ2, or the ICD of teneurin 1, and from proteins with which it does not complex, such as RanGAP1. Another novel aspect is that HINT1 is the first SUMO protease described whose activity is regulated by zinc ions, calcium-calmodulin (Ca^{2+} -CaM) and redox processes. Notably, human mutants of HINT1 responsible for causing ARAN-NM show altered SUMO protease activity, abolished in most of them and present, albeit deregulated, in a few. Moreover, with specific exceptions, these HINT1 mutants hardly establish associations with signaling proteins such as CaM, SUMO, Mu opioid (MOR), NMDA and σ 1 receptors, in addition to RGSZ2 and teneurin 1 ICD.

We have also described that HINT1, σ 1R and CaM interact with the amino- and carboxyl-terminal domains of several TRP-type receptors. Each cytosolic region analyzed shows a specific pattern in binding and competition between these signaling proteins. Similarly, the activity of σ 1R ligands is conditioned by the cytosolic TRP region to which the receptor binds "agonist bias". Moreover, we have characterized the association of TRPA1 with MOR and NMDA receptors in several structures of the nervous system. The presence of TRPA1-MOR and TRPA1-NMDAR complexes is modified in response to different pharmacological treatments and in models of inflammatory and neuropathic pain. CaM is essential in these associations, promoting the coupling of TRPA1 with MOR and the NR1 subunit of NMDAR.

The results of this Doctoral Thesis have demonstrated that mice lacking HINT1 meet the requirements to be used as an animal model for the study of potential drugs or the identification of new therapeutic targets for human bipolar disorder. At the molecular level, we have described the SUMO protease activity of HINT1, which is altered in ARAN-NM mutants, as well as its interactions with different signaling proteins. Our conclusion is that early blockade of the expression of these mutants should substantially reduce the progression of motor impairment in individuals affected by these mutations. Therefore, this study brings new insights into the function of HINT1 in the nervous system, with special relevance to its role in manic behaviors, bipolar disorder and ARAN-NM.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AMP	Adenosín monofosfato
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ARAN-NM	<i>Autosomal recessive axonal neuropathy with neuromyotonia</i> (neuropatía axonal recesiva autosómica con neuromiotonía)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATP	Adenosín trifosfato
BScr	Ratones <i>BlackSwiss</i> de Charles River
BStac	Ratones <i>BlackSwiss</i> de la granja Taconic
CaM	Calmodulina
CaMKII	<i>Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II</i> (proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina)
CCI	<i>Chronic constriction injury</i> (lesión por constricción crónica)
CRD	<i>Cystein-rich domain</i> (dominio rico en cisteínas)
Ct	Extremo carboxilo terminal
DAG	Diacilglicerol
DeSI	<i>Desumoylating isopeptidase</i> (isopeptidasa sumoilasa)
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
GDP	Guanosín difosfato
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> (receptor acoplado a proteína G)
GSK3β	Glucógeno sintasa quinasa 3 beta
GST	Glutation-S-transferasa
GTP	Guanosín trifosfato
HINT1	<i>Histidine triad nucleotide-binding protein 1</i>
ICD	Dominio intracelular
Icv	Intracerebroventricular
Ip	Intraperitoneal
Ipl	Intraplantar
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato

KO	<i>Knock-out</i>
LTD	<i>Long-term depression</i> (depresión a largo plazo)
LTP	<i>Long-term potentiation</i> (potenciación a largo plazo)
MOR	Mu-opioid receptor (receptor opioide Mu)
NMDA	Ácido <i>N</i> -metil-D-aspartico
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
Nt	Extremo amino terminal
PAG	<i>Periaqueductal gray</i> (sustancia gris periacueductal)
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PKCi	Inhibidor de la proteína quinasa C
RanGAP1	<i>Ran GTPase-activating protein 1</i> (proteína activadora de la GTPasa Ran1)
RGS	<i>Regulator of G protein signaling</i> (regulador de la señalización de las proteínas G)
SENP	<i>Sentrin-specific protease 1</i> (proteasa específica de sentrina)
σ1R	Receptor sigma 1
SIM	<i>SUMO-interacting motif</i> (sitio de interacción de SUMO)
SNAP	S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina
SNC	Sistema nervioso central
SUMO	<i>Small ubiquitin-related modifier</i> (modificador de pequeño tamaño relacionado con la ubiquitina)
TpAd	<i>Phosphoramidate tryptamine AMP</i> (triptamina fosforamidato)
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis (2-piridilmetil) etilenediamina
TpGc	<i>Guanosine-5'-tryptamine carbamate</i> (carbamato guanosina-5'-triptamina)
TRP	<i>Transient Receptor Potential</i> (receptor de potencial transitorio)
USLP1	<i>Ubiquitin-specific protease-like 1</i> (enzima tipo ubiquitinasa)
WT	<i>Wild-type</i> (salvaje)

Introducción

1. Superfamilia HIT

La proteína *histidine triad nucleotide-binding protein 1* (HINT1) forma parte de la superfamilia de la tríada de histidinas (HIT) cuyos miembros se caracterizan por contener cerca de su extremo carboxilo terminal el motivo histidina-X-histidina-X-histidina-X-X (siendo X un aminoácido hidrofóbico) (Seraphin, 1992). En función de su actividad catalítica, los estudios filogenéticos dividen la superfamilia HIT en 5 ramas (Figura 1): proteínas *fragile histidine triad* (FHIT), proteínas HINT, la galactosa 1-fosfato uridiltransferasa (GalT), la aprataxina y la pirofosfatasa DcpS (Brenner, 2002; Kijas y col., 2006). Estudios previos consideran a la HINT1 como la proteína HIT ancestral: el análisis de las secuencias muestra que la HINT es el nexo entre las familias FHIT y GalT (Brenner, 1997), y está presente en un amplio rango de organismos desde arqueas y bacterias hasta mamíferos (Robinson y Aitken, 1994).

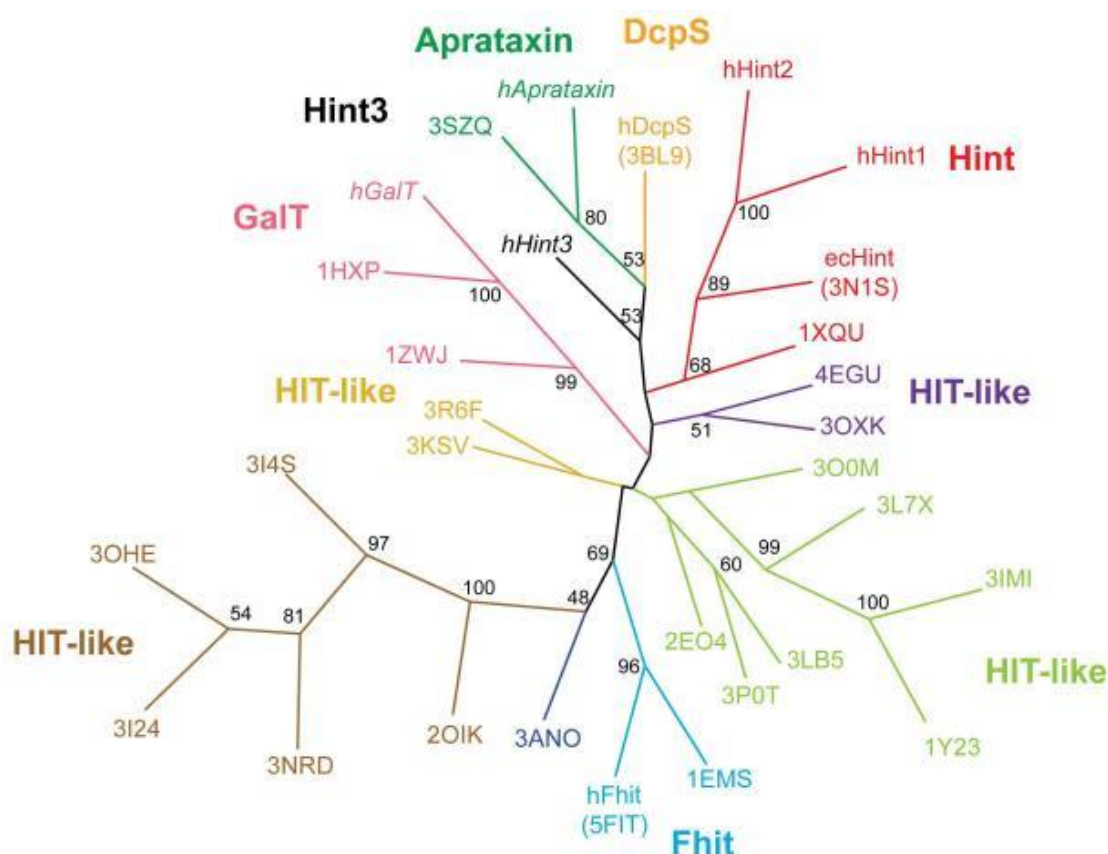


Figura 1. Árbol filogenético de la superfamilia HIT. En cursiva se señalan los miembros que no han sido caracterizados estructuralmente. La familia Hint está en rojo. Los nuevos elementos identificados *HIT-like* están en morado, verde claro, marrón y amarillo. La familia Fhit está marcada en azul claro, y en azul oscuro una proteína bioquímicamente no caracterizada que podría ser una Fhit de *Mycobacterium tuberculosis*. Los números de las ramas indican la fiabilidad de la disposición de dicha rama tras 100 alineamientos múltiples de conjuntos similares de secuencias (fiabilidad en valor porcentual). Adaptado de Maize y col., (2013).

Los miembros de la familia HIT se caracterizan por unir nucleótidos y actuar como nucleotidiltransferasas e hidrolasas, siendo la tríada de histidinas el centro catalítico. La segunda histidina (histidina-X-**histidina**-X-histidina-X-X) está estrictamente conservada, mientras que la tercera histidina puede variar, aunque también forma parte del centro catalítico. El tercer residuo implicado en la actividad catalítica suele ser también una histidina, pero no se localiza en la secuencia contigua. En la HINT1, la tríada está compuesta por His-51, His-112 y His-114; únicamente las familias constituidas por aprataxina, FHIT y HINT conservan la secuencia y la tríada de histidinas catalíticas (Lima y col., 1996; Maize y col., 2013).

La proteína GalT interviene en el metabolismo de la galactosa, transfiriendo la uridina difosfato (UDP) desde la glucosa-UDP a la galactosa; la pérdida de esta enzima produce galactosemia y defectos en el desarrollo a largo plazo como cataratas y retraso mental (Brenner, 2002). La GalT es el único miembro de la superfamilia HIT con un papel definido en el metabolismo de los carbohidratos y no está implicada en cáncer. Otra rama de la superfamilia HIT está compuesta por la enzima DcpS, que degrada la caperuza metilada estabilizadora de la región 5' de los ARN mensajeros (ARNm), induciendo así su eliminación por otras enzimas (Milac y col., 2014). La DcpS se localiza tanto en el núcleo como en el citosol, y su expresión se induce por señales de estrés que provocan la producción de ARNm incompletos. Por lo tanto, esta enzima participa en la regulación de la expresión génica y una menor actividad de DcpS afectaría a la homeostasis celular y posible carcinogénesis (Gu y col., 2004; Bail y Kiledjian, 2008). Al contrario que otros miembros de la superfamilia HIT, la DcpS necesita de un dominio amino terminal adicional para su actividad, y experimenta un cambio conformacional durante la catálisis (Liu y col., 2002). Además, la actividad exacerbada de la DcpS podría causar atrofia muscular espinal, ya que reduce la estabilidad de la proteína SMN y la expresión del gen *SMN2*, fundamental en la supervivencia de las motoneuronas (Singh y col., 2008).

La aprataxina, una enzima específica del núcleo y el nucleolo, posee un dominio de dedo de zinc y un dominio *forkhead* de unión al ADN además del motivo HIT. Esta proteína hidroliza dinucleótidos polifosfatos y fosforamidatos, e interviene en la reparación del ADN de cadena simple y doble (Kijas y col., 2006). La mutación del gen de la aprataxina (*APTX*) causa la enfermedad degenerativa de ataxia con apraxia oculomotora, que cursa con la pérdida del control del movimiento del ojo y otros músculos faciales. La mayoría de las mutaciones descritas en *APTX* se localizan en la región que codifica para el dominio

HIT, sugiriendo que este motivo es fundamental para el correcto funcionamiento neurológico. Estas mutaciones reducen la estabilidad o los niveles celulares de aprataxina, que deja de ser funcional (Ahel y col., 2006; Martin y col., 2011).

El apelativo “frágil” de la proteína FHIT se debe a su alta tasa de mutación en múltiples cánceres. *FHIT* no se expresa o lo hace de manera muy reducida en múltiples lesiones preneoplásicas y en más del 50 % de los cánceres. La FHIT favorece la producción de especies reactivas de oxígeno, induciendo la apoptosis por la vía dependiente de caspasas en células cancerosas con elevados niveles de daño en el ADN (Trapasso y col., 2003; Trapasso y col., 2008). Por este motivo, la FHIT se ha caracterizado como una proteína supresora de tumores, y su ausencia permite sobrevivir a las células tumorales aún con altos niveles de daño genómico. (Huebner y Croce, 2003). De modo similar a la aprataxina, la FHIT posee actividad hidrolasa sobre dinucleótidos polifosfatos, además de una función fosforamidasa moderada, aunque se desconoce si esta actividad es relevante a nivel biológico (Huang y col., 2004).

2. Familia HINT

2.1. HINT1

La rama de las HINT es la más conservada de la superfamilia HIT, con un alto rango de homología entre especies: la proteína humana HINT1 presenta un 96 % y un 53 % de similitud con la proteína bovina y del maíz, respectivamente (Brzoska y col., 1996). Al menos un miembro de la familia HINT está codificado en el genoma de todos los organismos analizados. En humanos, la familia HINT consta de 3 miembros: HINT1, HINT2 y HINT3. La HINT1 comparte un 61 % de secuencia con la HINT2, pero sólo un 28 % con la HINT3 (Maize y col., 2013). El gen *HINT1* se localiza en el cromosoma 5, posición 5q23.3, cuya transcripción resulta en un único ARNm codificante (Brzoska y col., 1996).

La proteína HINT1 se aisló por primera vez de cerebro bovino, identificándose como un potente inhibidor de la proteína quinasa C (PKC α) (McDonald y Walsh, 1985; Pearson y col., 1990). La HINT1 es una proteína ubicua, encontrándose en cerebro, hígado, riñón, próstata y colon. Se localiza en todo el sistema nervioso central (SNC), siendo especialmente abundante en neuronas del sistema olfatorio, corteza cerebral, hipocampo y

parte del tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, puente troncoencefálico y bulbo raquídeo (Liu y col., 2008).

A nivel celular, la HINT1 se encuentra en membrana plasmática, núcleo y citosol (Brzoska y col., 1996). En la membrana plasmática, la HINT1 actúa como chaperona y/o proteína de andamiaje interaccionando con una amplia variedad de proteínas de señalización, entre ellas diferentes receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Guang y col., 2004; Rodríguez-Muñoz y col., 2011a), PKC, proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G (RGS) (Ajit y col., 2007) y receptores de glutamato *N*-metil-D-aspártico (NMDARs) (Rodríguez-Muñoz y col., 2015a). En el núcleo, la HINT1 juega un papel importante como proteína represora de la transcripción génica (Su y col., 2003; Li y col., 2006).

La proteína HINT1 humana consta de 126 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 14 kDa y una fuerte carga negativa. Los datos obtenidos de estudios estructurales, ensayos de doble híbrido en levaduras y la purificación bioquímica de la HINT1 muestran que esta proteína puede existir en forma de homodímero, interaccionando a través de sus secuencias C-terminales (Pearson y col., 1990; Lima y col., 1996).

Cada monómero tiene dos hélices α (A y B) y cinco estructuras β (1-5) que conforman una lámina β antiparalela. La superficie de contacto de ambos monómeros genera un núcleo altamente hidrofóbico constituido por las hélices B enfrentadas y los extremos C-terminales (Figura 2). Se ha propuesto que la triada catalítica de histidinas sería la responsable de la unión de zinc por la HINT1, aunque este metal no es necesario para la formación del homodímero (Lima y col., 1996; Mozier y col., 1991).

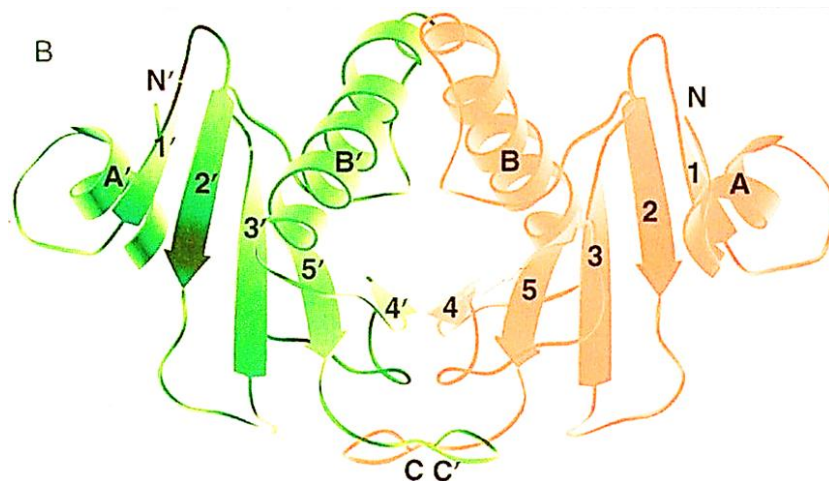


Figura 2. Representación esquemática en 3D de un homodímero de la HINT1. Cada monómero tiene dos hélices α (A y B, A' y B') y cinco láminas β (1-5, 1'-5'). Adaptado de Lima y col., (1996).

2.1.1. Actividad enzimática

La familia HINT fue identificada inicialmente por su actividad hidrolasa sobre adenosina-5'-*O*-monofosforamidatos (AMP-NH₂) y acil-adenilatos. El AMP-NH₂ es un soluto intracelular que se sintetiza a partir de AMP-SO₄ y amonio en múltiples organismos eucariotas, sin embargo, su importancia fisiológica se desconoce y quizá no sea el sustrato natural de la HINT1. La actividad hidrolasa de la HINT1 depende de la segunda histidina del dominio HIT, dado que su mutación a alanina (H112A) la abole. A diferencia de la FHIT, la HINT1 no hidroliza dinucleótidos polifosfatos como la diadenosina-polifosfatos o el ATP. Paralelamente, mediante análisis bioquímicos *in vitro* se ha detectado que la HINT1 puede unir diferentes nucleótidos, incluyendo Ap₄A, Ap₃A, además de ADP, AMP y AMP-NH₂ (Gilmour y col., 1997; Bieganowski y col., 2002; Chou y col., 2007a).

El mecanismo propuesto de la actividad hidrolasa catalizada por la HINT1 seguiría el mismo patrón que la actividad de la GalT y la FHIT. Inicialmente, la His112 conservada del dominio HIT de la HINT1 realiza un ataque nucleofílico sobre el sustrato. Como resultado, se genera un nucleósido monofosfato que se libera tras la hidrólisis acuosa del intermediario enzimático His-AMP (Brenner y col., 2002). Chou y colaboradores (2007a) descubrieron que la región C-terminal de la HINT1 es responsable de la especificidad de sustratos fosforamidatos y con el lisil-AMP. La formación de homodímeros no es necesaria para la actividad enzimática hidrolasa, sino que cada monómero contiene un sitio activo completamente funcional, que no participa en la interfaz del dímero.

Por otra parte, la HINT1 cataliza la hidrólisis del lisil-adenilato (lisil-AMP) generados por la lisil-ARN de transferencia (ARNt) sintetasa (Chou y col., 2007b) y la desulfuración de nucleósidos 5'-*O*-fosfortiolados (Krakowiak y col., 2007; Ozga y col., 2010). Las aminoacil-ARNt sintetasas son unas enzimas esenciales que cargan los aminoácidos en su correspondiente ARNt para la formación de los aminoacil-ARNt. Estas proteínas están implicadas en múltiples procesos fisiológicos como la transcripción, traducción, *splicing*, inflamación, angiogénesis y apoptosis (Park y col., 2005).

La caracterización enzimática de la HINT1 se ha llevado a cabo enteramente mediante ensayos *in vitro*, desconociéndose aún sus sustratos naturales. Además, la actividad enzimática de la HINT1 es independiente de su actividad pro-apoptótica ya que el mutante H112N, que es la histidina fundamental del centro catalítico, es capaz de inducir la apoptosis, aunque su actividad hidrolasa esté alterada (Weiske y Huber, 2006).

2.1.2. Asociación con factores de transcripción

La presencia de la HINT1 en el núcleo celular responde a su función como represor transcripcional: se la considera una proteína supresora de tumores ya que se recluta como respuesta al daño celular, desencadena la apoptosis e inhibe la proliferación de células tumorales en diversos cánceres (Su y col., 2003; Weiske y Huber, 2006; Li y col., 2006; Wang y col., 2007; Li y col., 2008; Zhang y col., 2009; Wei y col., 2018). De hecho, los ratones *knock-out* (KO) de la HINT1 (HINT1^{-/-}) y heterocigotos (HINT1^{+/-}) presentan unos niveles elevados de carcinogénesis con respecto a sus controles *wild-type* (WT) (Li y col., 2006).

La HINT1 participa en la respuesta al daño por radiación ionizante en el ADN que provoca roturas de doble banda en el genoma. Para ello, la HINT1 se asocia con la histona fosforilada γ -H2AX y la proteína ATM. La γ -H2AX actúa como proteína de ensamblaje, promoviendo la configuración del resto del complejo de reparación. Tras una rotura de doble banda en el ADN la ATM se activa por una acetilación y una autofosforilación, y fosforila los siguientes efectores de la vía como Chk1, Chk2 y p53, participantes de los mecanismos de control celular o la apoptosis. La ausencia de la HINT1 no afecta a la formación del complejo reparador, pero sí a su eliminación tras la reparación del daño en el ADN, así como a la correcta acetilación tanto de la γ -H2AX como de la ATM. Como consecuencia, los fibroblastos embrionarios sin expresión de *HINT1* experimentan menos apoptosis tras experimentar un daño por radiación ionizante que los fibroblastos control (Su y col., 2003; Li y col., 2008).

Asimismo, la proteína HINT1 regula las rutas apoptóticas, induciendo la activación de la caspasa 3, la liberación del citocromo c, la expresión de la p53 y del factor pro-apoptótico Bax, a la vez que inhibe la expresión del factor anti-apoptótico Bcl-2. De hecho, la HINT1 forma parte del complejo de la histona Tip60 con actividad acetiltransferasa, a través del cual regula la expresión del gen *Bax* (Weiske y Huber, 2006).

La HINT1 interacciona con diversos factores de transcripción a través de los cuales regula la expresión génica. Por ejemplo, la HINT1 se asocia por su extremo amino terminal con Pontin y Reptin; dos proteínas altamente conservadas en la filogenia, ya que son componentes esenciales de los complejos de remodelación de la cromatina. Pontin y Reptin forman parte de las ATPasas asociadas a varias actividades celulares (AAA⁺ ATPasas), estando sobreexpresadas en cáncer colorrectal y carcinoma hepatocelular (Carlson y col.,

2003; Li y col., 2005; Ammelburg y col., 2006). Estas dos proteínas están implicadas en el crecimiento y la viabilidad celular, y son necesarias para la biogénesis de la telomerasa en humanos. Pontin y Reptin regulan de manera antagonista la actividad transcripcional de la β -catenina en la ruta de señalización de Wnt: Pontin potencia la actividad de la β -catenina, mientras que Reptin la reprime (Bauer y col., 1998; Rottbauer y col., 2002). A través de su interacción con Pontin y Reptin, la HINT1 siempre inhibe la transcripción mediada por el factor celular T/ β -catenina, reduciendo la expresión de los genes de la ciclina D1 y de la axina 2 (Weiske y Huber, 2005; Wang y col., 2009).

Del mismo modo, se ha descrito la asociación de la HINT1 con otros factores como la quinasa dependiente de ciclina 7 (Cdk7). La HINT1 modifica la especificidad de sustrato de Cdk7, favoreciendo que esta enzima fosforile el dominio carboxilo terminal de la ARN polimerasa II, lo que facilita el procesamiento de los transcritos nacientes (Korsisaari y Mäkelä, 2000).

La proteína p27 es un inhibidor de las Cdks que apenas está expresada en algunos tumores. Presenta unos niveles altos de expresión en células en quiescencia, que se reducen al entrar en el ciclo celular. Los niveles de p27 son regulados positivamente por la HINT1, que se une al complejo de la ubiquitina ligasa SCF^{SKP2} y bloquea la ubiquitinación de la p27 y, por tanto, su degradación. Por otro lado, la HINT1 inhibe la expresión de *Src*, que fosforila a la p27, reduciendo su estabilidad (Cen y col., 2009).

Las teneurinas son grandes proteínas transmembrana de tipo II necesarias para el correcto desarrollo del SNC, lo que explica su gran conservación en la filogenia. Son proteínas esenciales para el crecimiento de dendritas y axones, y el establecimiento de las sinapsis; se han estudiado especialmente en el desarrollo de los circuitos visuales (Kenzelmann y col., 2007). En mamíferos, la familia de las teneurinas engloba a 4 miembros (Ten 1-4) de unos 300 kDa. El extremo amino terminal constituye el dominio intracelular (ICD), seguido de una pequeña región hidrofóbica que funciona como dominio transmembrana y una gran región globular extracelular de unos 2400 aminoácidos. La parte extracelular incluye el extremo carboxilo terminal y diversos dominios que permiten a la proteína establecer interacciones homo- y heterofílicas con las latrofilinas, necesarias para la correcta sinaptogénesis (Oohashi y col., 1999; Tucker y Chiquet-Ehrismann, 2006; Boucard y col., 2014). Entre estos dominios destacan un dominio rico en tirosinas y ocho dominios tipo factor de crecimiento epidérmico que facilitan la formación de dímeros. En el extremo carboxilo terminal se encuentra el péptido asociado al C-terminal de la teneurina

(TCAP), con una secuencia similar al factor liberador de la corticotropina. El TCAP se libera al medio y actúa como factor paracrino promoviendo el crecimiento neuronal, regulando la morfología de las neuritas, e interviniendo en los comportamientos relacionados con el estrés y la ansiedad (Al Chawaf y col., 2007; Tan y col., 2009).

El ICD de las teneurinas pesa aproximadamente 45 kDa y contiene varios residuos fosforilables de tirosina, dos dominios de unión a calcio tipo mano EF y dos dominios ricos en prolina tipo SH₃, así como una señal de localización celular. Tras una señal extracelular recibida por los dominios exteriores de la teneurina, el ICD se corta por la secuencia conservada RKRK y, a continuación, se transloca al núcleo, donde ejerce su función como factor de transcripción (Figura 3). Es fundamental que la teneurina se asocie con proteínas que sí puedan interactuar con el genoma, ya que ella no contiene ninguna secuencia de unión al ADN.

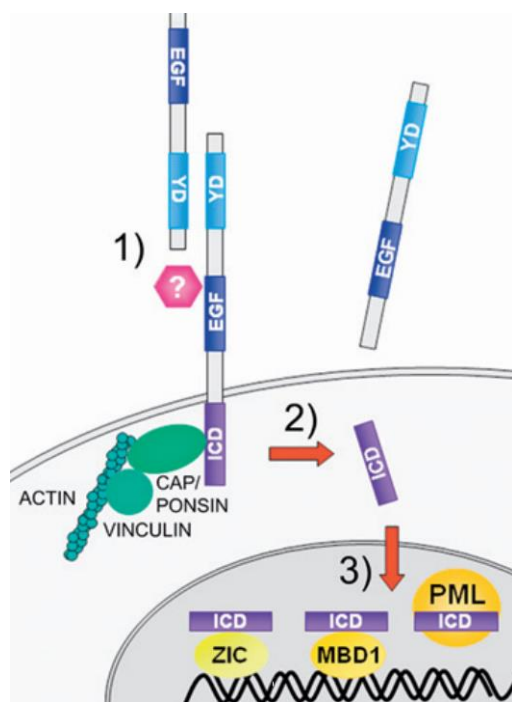


Figura 3. Hipótesis de señalización de las teneurinas.

1) Una señal extracelular, que puede ser una interacción homofílica o la unión de un ligando aún desconocido, desencadena el mecanismo. 2) Se produce el corte proteolítico, liberándose por un lado el dominio extracelular y por otro, el ICD. 3) El ICD se transloca al núcleo, donde se asocia con los cuerpos PML y proteínas nucleares como la MBD1, una proteína que se une a las regiones CpG metiladas, y Zic, una familia de factores de transcripción implicadas en el desarrollo neuronal. Adicionalmente, el ICD puede unirse a CAP/Ponsin y vinculina, a través de los que se acopla al citoesqueleto de actina, esencial para el crecimiento de las neuritas. Adaptado de Kenzelmann y col., (2007).

En el núcleo, la teneurina 1 se asocia con el represor transcripcional MBD1, mientras que la teneurina 2 colocaliza con los cuerpos PML y afecta a la transcripción mediada por Zic (Bagutti y col., 2003; Nunes y col., 2005). Por otro lado, la HINT1 se une y reprime al factor de transcripción asociado con la microftalmia (MITF), que suele estar sobreexpresado en el 10 - 20 % de los melanomas aumentando la quimio-resistencia de los melanocitos tumorales. El ICD de la teneurina 1 se asocia con HINT1, liberando a MITF

de su represor. Por tanto, la teneurina 1 regula positivamente la transcripción dependiente del MITF (Genovese y col., 2012; Schöler y col., 2015).

2.2. HINT2 y HINT3

La proteína HINT2, constituida por una cadena polipeptídica de 163 aminoácidos, se localiza principalmente en las mitocondrias de las células hepáticas, pancreáticas y glándula adrenal. Al igual que la HINT1, la HINT2 actúa como adenosina fosforamidasa, pero su eficacia catalítica es diez veces superior a la de la HINT1. La mutación de la HINT2 en la segunda histidina del dominio HIT, la His149, provoca la pérdida de la actividad enzimática (Bieganowski y col., 2002; Martin y col., 2006).

De acuerdo con su localización celular, la HINT2 está implicada en la apoptosis por la vía mitocondrial. Su sobreexpresión en células HepG2 provoca cambios significativos en el potencial de la membrana mitocondrial, niveles elevados de caspasas 3, 7 y 9, y tumores más pequeños que los formados por las células HepG2 control. Sin embargo, la sobreexpresión del mutante H149A del centro catalítico de la HINT2 apenas produce esos cambios en las células cancerosas.

Respecto a tumores humanos, la expresión de *HINT2* está muy reducida en el carcinoma hepatocelular, igual que *HINT1*, aunque los niveles de ARNm de la HINT3 se mantienen invariables. Por tanto, parece que la HINT2 inhibe la progresión del carcinoma hepatocelular, además del colorrectal y del de mama (Martin y col., 2006; Li y col., 2017).

Los ratones *HINT2*^{-/-} presentan una morfología celular alterada y niveles elevados de acilación proteica. Se ha propuesto que la HINT2 es necesaria para la regulación del metabolismo de la glucosa y lipídico, pudiendo estar involucrada en la enfermedad del hígado graso (Anderson y col., 2013; Martin y col., 2013).

La HINT3 es una proteína de 165 aminoácidos que puede formar oligómeros, localizándose tanto en el citosol como en el núcleo de las células eucariotas. Si bien la HINT3 hidroliza aminoacil-adenilatos e interacciona con las aminoacil-ARNt sintetasas de manera similar a la HINT1, su eficacia de hidrólisis de fosforamidatos es de 370 a 2000 veces menor que la de la HINT1. Actualmente, la pertenencia de la HINT3 a la familia HINT es controvertida (Chou y col., 2007c).

2.3. Patologías asociadas a las proteínas HINT

2.3.1. Cáncer

La proteína HINT1 se considera una proteína supresora de tumores, inhibiendo la progresión de diversos cánceres: gástricos, de mama, de ovario, pulmonar y hepático (Su y col., 2003; Zhang y col., 2009; Huang y col., 2011). Como se ha mencionado anteriormente, la HINT1 actúa en el núcleo suprimiendo la actividad de factores de transcripción habitualmente relacionados con procesos tumorales, tales como la β -catenina, la proteína activadora 1 (AP-1) y MITF, entre otros. De forma paralela, la HINT1 potencia las rutas pro-apoptóticas y suprime las anti-apoptóticas (Weiske y Huber, 2006; Wang et al, 2007; Genovese y col., 2012).

Los ratones $HINT1^{-/-}$ y $HINT1^{+/-}$ presentan unos niveles elevados de carcinogénesis con respecto a sus congéneres WT. De forma coherente, la reintroducción de la expresión de *HINT1* en células pulmonares tumorales reduce la actividad cancerosa. Esto implica que la HINT1 es haploinsuficiente como supresora de tumores, siendo necesario que ambos alelos sean funcionales para que la HINT1 actúe como tal (Yuan y col., 2004; Li y col., 2006).

La menor expresión de *HINT1* en los diferentes tumores parece deberse a que su promotor se suele encontrar hipermetilado en las células cancerosas. Esta modificación genómica se asocia con una menor expresión de este gen en el tejido tumoral. La metiltransferasa 1 del ADN (DNMT1) podría ser la responsable de la hipermetilación de *HINT1*.

Los microARNs son pequeños ARNs no codificantes de 20-24 nucleótidos que regulan la expresión génica asociándose a la región 3'UTR del ARNm diana. Esta unión causa la supresión de la traducción de la proteína y potencia la degradación del ARNm. El microARN miR-342 apenas se expresa en el cáncer colorrectal y la recuperación de sus niveles normales provoca la reducción de la expresión de *DNMT1*, que está sobreexpresada en este tumor. Como consecuencia, bajan los niveles de metilación de diversos promotores génicos, volviéndose a expresar genes como *ADAM23*, *HINT1*, *RASSF1A* y *RECK*, que inhiben el crecimiento tumoral y la metástasis (Zhang y col., 2009; Wang y col., 2011).

2.3.2. Trastornos motores

La expresión generalizada de *HINT1* en el SNC sugiere que esta proteína puede ser necesaria para el funcionamiento neuronal normal y que, por tanto, su desregulación puede llevar a situaciones patológicas. Los niveles de la HINT1 son especialmente elevados en el nervio ciático, indicando que esta proteína es un componente esencial para el sistema nervioso periférico (Zimon y col., 2012). Así, las alteraciones en la HINT1, o en proteínas con las que interacciona, se asocian con diversos desórdenes motores. Por ejemplo, la progresión de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se retrasa con el riluzol y la gaciclidina, dos fármacos que reducen la actividad de los receptores NMDA con los que la HINT1 se acopla en la membrana plasmática (Lu y col., 2016).

Asimismo, la HINT1 se asocia con proteínas relevantes para el funcionamiento normal de las vías dopaminérgicas motoras, tales como la teneurina 1 (Schöler y col., 2015) y el receptor sigma 1 ($\sigma 1R$) (Rodríguez-Muñoz y col., 2015a). Las motoneuronas están enriquecidas en el $\sigma 1R$ (Gunlach y col., 1986; Mavlyutov y col., 2010), cuyas mutaciones se han asociado con neuropatías motoras distales hereditarias (Gregianin y col., 2016; Almendra y col., 2018) y ELA (Al-Saif y col., 2011; Ullah y col., 2015; Watanabe y col., 2018). De igual modo, pacientes con temblor esencial presentan mutaciones en la teneurina 4 (Hor y col., 2015), mientras que alteraciones en la teneurina 1 se consideran potencialmente patogénicas en la parálisis cerebral, una patología que engloba un grupo heterogéneo de trastornos en los que el movimiento y la postura están afectados (McMichael y col., 2015).

En este sentido, un estudio de 2012 relacionó mutaciones puntuales recesivas en *HINT1* con una variante infrecuente de neuropatía periférica hereditaria tipo Charcot-Marie-Tooth, denominada ARAN-NM (*autosomal recessive axonal neuropathy with neuromyotonia*) (Zimon y col., 2012). La ARAN-NM es una enfermedad rara, con una incidencia menor de 1:1.000.000 (*Orphanet*). Este trastorno cursa con una polineuropatía axonal de progresión lenta, motora más que sensitiva, combinada con una neuromiotonía, que incluye actividad muscular espontánea en reposo (mioquimia), relajación muscular alterada (pseudomiotonía) y contracturas en manos y pies. Los pacientes presentan debilidad distal en las extremidades inferiores con alteración de la marcha, rigidez muscular, fasciculaciones y calambres en manos y piernas que empeoran con el frío, reflejos tendinosos de reducidos a ausentes, atrofia intrínseca de la musculatura de la mano y, de forma variable, leve afectación sensitiva distal (Vallat y col., 2013).

Los 79 pacientes diagnosticados hasta la fecha con ARAN-NM se reparten entre Europa, Norte América y China. La distribución de la patología no es aleatoria, sino que la mayoría de los afectados proceden de países del centro o sureste de Europa y Turquía (Peeters y col., 2017). Actualmente hay descritas 15 mutaciones de la *HINT1* causantes de la ARAN-NM (Zimon y col., 2012; Lassuthová y col., 2015; Rauchenzauner y col., 2016; Meng y col., 2018; Wang y col., 2019), siendo las más comunes R37P, C84R y H112N (Peeters y col., 2017). En la Tabla 1 se muestran las mutaciones puntuales de la *HINT1* descritas en humanos y causantes de la ARAN-NM.

Cambio de aminoácido	Cambio de nucleótido	Familias (casos)	Edad de comienzo en años (mín-máx)	Autor
p.[Glu34Lys]+[Glu34Lys]	c.[100G>A]+[100G>A]	1 (1)	3	Rauchenzauner y col., (2016)
p.[Arg37Pro]+[Arg37Pro]	c.[110G>C]+[110G>C]	23 (37)	10 (3-25)	Zimon y col., (2012)
p.[Arg37Pro]+[Gln106*]	c.[110G>C]+[217G>A]	1 (2)	9 (8-10)	Lassuthová y col., (2015)
p.[Cys38Arg]+[Lys57Asn]	c.[112T>C]+[171G>C]	1 (1)	2	Meng y col., (2018)
p.[Cys38Arg]+[Cys38Arg]	c.[112T>C]+[112T>C]	1 (1)	10	Meng y col., (2018)
p.[Phe33Ser]+[Cys38Arg]	c.[98T>C]+[112T>C]	1 (1)	16	Meng y col., (2018)
p.[Arg37Pro]+[Cys84Arg]	c.[110G>C]+[250T>C]	1 (2)	10	Zimon y col., (2012)
p.[Arg37Pro]+[Gly89Val]	c.[110G>C]+[266G>T]	2 (2)	9,5 (7-12)	Zimon y col., (2012)
p.[Arg37Pro]+[His112Asn]	c.[110G>C]+[334C>A]	1 (2)	8 (6-10)	Zimon y col., (2012)
p.[His51Arg]+[Cys84Arg]	c.[152*>G]+[250T>C]	1 (1)	12	Zimon y col., (2012)
p.[Gln62*]+[Gly93Asp]	c.[182C>T]+[278G>A]	1 (2)	10	Zimon y col., (2012)
p.[Val97Met]+[Val97Met]	c.[289G>A]+[289G>A]	1 (1)	13	Wang y col., (2019)
p.[His112Asn]+[His112Asn]	c.[334C>A]+[334C>A]	3 (3)	6 (4-8)	Zimon y col., (2012)
p.[Trp123*]+[Trp123*]	c.[368G>A]+[368G>A]	1 (1)	12	Zimon y col., (2012)

Tabla 1. Mutaciones puntuales recesivas de la *HINT1* causantes de la ARAN-NM, junto con el cambio de nucleótido en el gen *HINT1*, el número de familias dónde se han descrito las mutaciones inicialmente y los miembros afectados, la edad de comienzo de los síntomas y el artículo científico inicial en el que se publicaron.

Sólo algunos de los mutantes de la HINT1 como R37P, G93D y W123* manifiestan alteraciones en su actividad fosforamidasasa o en la formación de dímeros (Shah y col., 2018). Otros, como los mutantes C84R y G89V mantienen su actividad enzimática normal, la cual es independiente de su actividad pro-apoptótica (Weiske y Huber, 2006). Actualmente no se dispone de modelos animales de los mutantes, pero sí de ratones KO de la HINT1, que no manifiestan desórdenes motores o neuropatías periféricas (Seburn y col., 2014).

2.3.3. Trastornos psiquiátricos

Diferentes estudios han relacionado a la HINT1 con desórdenes neuropsiquiátricos como esquizofrenia, trastorno bipolar, ansiedad, dolor y analgesia, y adicción a drogas. Estos trastornos son complejos de estudiar, debido a la mezcla de los componentes genético y ambiental en su etiología (Liu y col., 2017).

Los pacientes esquizofrénicos manifiestan síntomas positivos, como alucinaciones, delirios y trastornos del pensamiento y del movimiento; síntomas negativos como aislamiento emocional, apatía y falta de atención; y síntomas cognitivos, afectivos y agresivos (Stahl, 2013). Por el contrario, el trastorno bipolar cursa con alternancia de periodos maniacos y depresivos. Mientras que las fases maniacas se caracterizan por exaltación del estado de ánimo, impulsividad, hiperactividad y menor necesidad de dormir, entre otras, los estados depresivos se identifican por pérdida de autoestima, fatiga, sentimientos de desesperanza, problemas de concentración, anhedonia, etc., (Logan y McClung, 2016).

El gen *HINT1* se localiza en la región genómica SPEC2/PDZ-GEF2/ACSL6 de 5q22-23, que está altamente relacionada con la esquizofrenia, y ciertas variantes del gen, en concreto ocho polimorfismos de nucleótido único, se han asociado con esta patología (Straub y col., 1997; Baron, 2001; Chen y col., 2006). De hecho, se ha observado una menor expresión de *HINT1* en la corteza prefrontal de pacientes esquizofrénicos (Vawter y col., 2002; Vawter y col., 2004; Varadarajulu y col., 2012; Rodríguez-Muñoz y col., 2017) y con trastorno bipolar (Elashoff y col., 2007). Por el contrario, los niveles de la HINT1 son elevados en la misma región cerebral de pacientes con depresión mayor (Martins-de-Souza y col., 2012). En modelos animales, los ratones deficientes de la HINT1 manifiestan una mayor locomoción en respuesta a anfetamina y a apomorfina, un agonista del receptor de

dopamina, en comparación con los ratones control HINT1^{+/+}. Esto sugiere que la ausencia de la HINT1 se relaciona con una desregulación de la transmisión postsináptica dopaminérgica (Barbier y col., 2007; Chen y col., 2008; Jackson y col., 2010).

El grupo de Varadarajulu (2011) ha descrito que los ratones HINT1^{-/-} presentan conductas “ansiosas” y la administración de nicotina las exacerba, siendo el diazepam incapaz de inducir una respuesta ansiolítica (Jackson y col., 2012). Curiosamente, este comportamiento “ansioso” únicamente se ha detectado en ratones macho, pero no en hembras, lo que indicaría que la ausencia de la HINT1 tiene un impacto diferente en función del sexo del individuo. Las mutaciones en *HINT1* también se han asociado con la dependencia a nicotina. La administración crónica de esta sustancia eleva la expresión de *HINT1* en el núcleo accumbens, la cual se puede revertir con un antagonista de nicotina. Además, los ratones HINT1^{-/-} no presentan síntomas somáticos de abstinencia tras su exposición a esta droga (Jackson y col., 2011; Jackson y col., 2013). Por otro lado, la administración de cocaína también es capaz de aumentar los niveles de la HINT1 en la corteza prefrontal, favoreciendo las conductas adictivas. Por tanto, en los fenotipos susceptibles de experimentar adicción a drogas, los niveles de la HINT1 serían elevados, facilitando el desarrollo de dependencia a estas sustancias (Romanova y col., 2010).

A través de su interacción con el receptor opioide Mu (MOR), la HINT1 está involucrada en la regulación del dolor y la analgesia. El síndrome de dolor regional complejo es una afección de dolor crónico. Esta situación se caracteriza por un fenómeno denominado hiperalgesia, la percepción exacerbada de las señales nociceptivas respecto a la duración o la intensidad del daño sufrido; y la alodinia, una sensación de dolor desencadenada por estímulos habitualmente indoloros. Esta situación patológica está causada por una disfunción del SNC, produciéndose una amplificación patológica de las señales nociceptivas en las redes de procesamiento del dolor en el SNC (Salter, 2005). En circunstancias normales, el procesamiento de los estímulos nociceptivos está regulado por mecanismos excitatorios e inhibitorios. Sin embargo, en esta situación patológica, el mecanismo excitatorio de transmisión vía receptores NMDA está potenciado (Liu y Salter, 2010). De hecho, este receptor está implicado en el rápido desarrollo de tolerancia a la morfina en el dolor crónico, y el uso de antagonistas revierte la hiperalgesia (Ghelardini y col., 2008). En el otro lado, el receptor MOR forma parte de los mecanismos inhibitorios de la transmisión nociceptiva; su activación por un agonista como la morfina causa analgesia. La HINT1 actúa de nexo entre ambos tipos de receptores, MOR y NMDAR,

siendo necesaria para que la activación del MOR se transmita al NMDAR y éste intervenga en la desensibilización del receptor opioide (Rodríguez-Muñoz y col., 2011a). En consecuencia, los animales *HINT1*^{-/-} presentan un umbral de dolor más alto y una mayor respuesta analgésica a la morfina que sus congéneres WT (Guang y col., 2004).

En ausencia de la *HINT1* también se desarrolla tolerancia a la morfina, pero no está relacionada con la actividad NMDAR. En el mismo sentido, la administración del inhibidor de la actividad enzimática de la *HINT1*, la guanosina-5'-triptamina carbamato (TpGc), potencia la analgesia de morfina y alivia la alodinia mecánica, a la vez que previene el desarrollo de tolerancia a los opioides (Garzón y col., 2015). Los ratones *HINT1*^{-/-} también manifiestan alteraciones en el test de la placa caliente, en el dolor inflamatorio inducido por formalina y el neuropático inducido por la ligadura del nervio ciático (Sánchez-Blázquez y col., 2013; Vicente-Sánchez y col., 2013; Liu y col., 2016). Por tanto, la *HINT1* sería un regulador negativo de la analgesia inducida por morfina y mediada por el MOR. Sin embargo, en un estudio con pacientes oncológicos con dolor crónico, no se encontró una correlación entre polimorfismos de nucleótido único en *HINT1* y la dosis de opioide administrada a dichos pacientes (Klepstad y col., 2011).

3. Señalización de la *HINT1* en la membrana plasmática

La proteína *HINT1* actúa como una chaperona y/o proteína de andamiaje en sus múltiples interacciones con diversas proteínas de señalización del SNC. Se acopla al extremo carboxilo terminal de varios GPCRs, entre ellos el MOR, el receptor cannabinoide tipo 1 (CB1R), los receptores de dopamina D1 y D2, de serotonina 1A y 2A y los receptores metabotrópicos de glutamato 2 y 5 (Guang y col., 2004; Garzón y col., 2009; Rodríguez-Muñoz y col., 2015b). Mediante el uso de péptidos solapantes en ensayos *pull-down* se ha determinado que la *HINT1* se une a la secuencia TSST (354-357 aminoácidos) de la cola citosólica del MOR (Rodríguez-Muñoz y col., 2011a).

La *HINT1* es fundamental para la señalización del receptor opioide y el control de su actividad. Esta proteína actúa como puente entre el MOR y las RGS de la familia Rz, tales como la RGSZ1 y RGSZ2 cuando éstas están unidas a la sintasa de óxido nítrico neural (nNOS) (Rodríguez-Muñoz y col., 2013). También en el entorno del MOR, la *HINT1* establece interacciones dependientes de zinc con PKC α , PKC γ y Raf-1, que se unen a través de sus respectivos dominios ricos en cisteínas (CDRs) (Ajit y col., 2007; Garzón y col.,

2011; Rodríguez-Muñoz y col., 2011b; Rodríguez-Muñoz y col., 2015a). El dominio citosólico C1 de la subunidad NR1 del receptor NMDA es otra de las proteínas de membrana con las que la HINT1 se asocia. Sin embargo, en presencia del $\sigma 1R$, que también se une a la NR1, la afinidad del NMDAR hacia la HINT1 disminuye. El tándem HINT1- $\sigma 1R$ coordina la regulación cruzada existente entre los GPCR-NMDAR (Rodríguez-Muñoz y col., 2015a; Rodríguez-Muñoz y col., 2015b).

3.1. Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)

Los GPCRs constituyen la mayor familia de proteínas de membrana codificadas en el genoma humano y son la diana de aproximadamente un tercio de los fármacos existentes. Son fundamentales en la comunicación entre el medio extracelular y el interior de la célula.

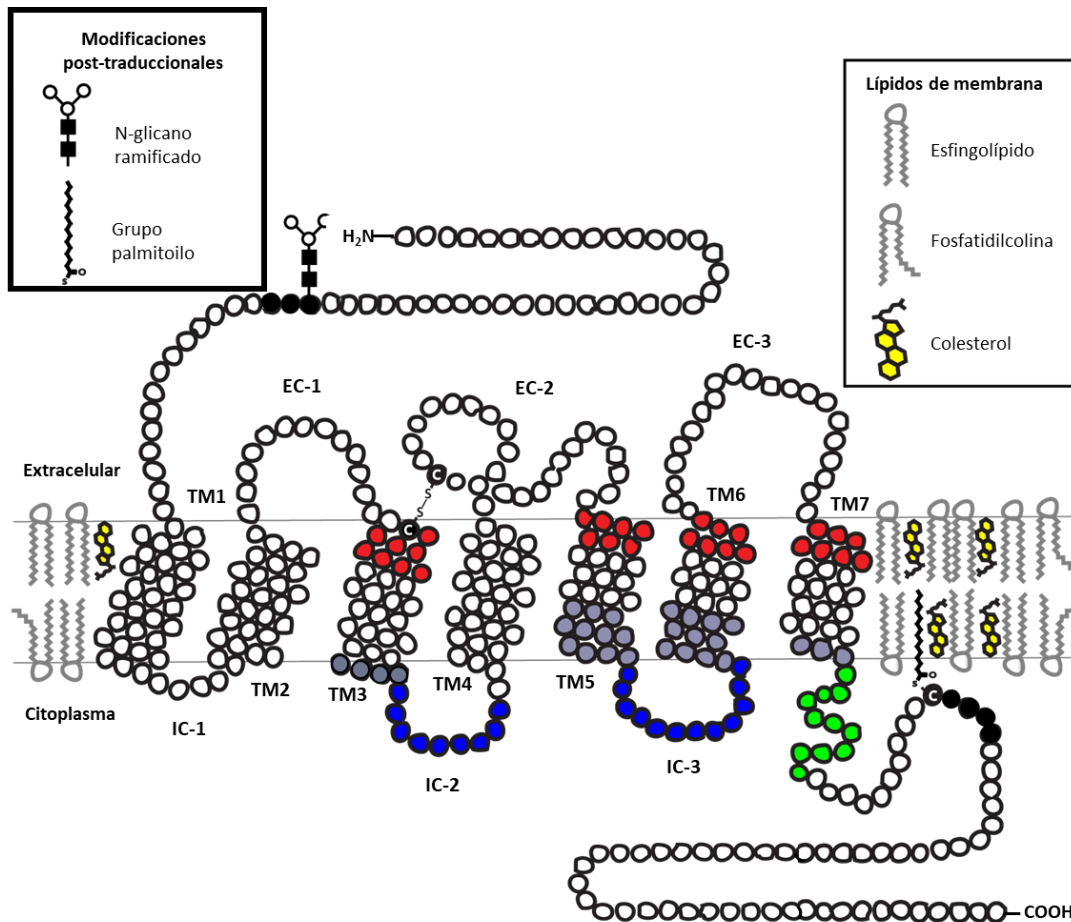


Figura 4. Estructura bidimensional de un GPCR. Se indican el extremo amino, las regiones transmembrana TM1-TM7, los bucles extracelulares EC1-EC3, los bucles intracelulares IC1-IC3 y el extremo carboxilo. En color rojo se muestran las zonas de interacción con los ligandos. En gris se marcan las regiones de unión con la cola carboxilo-terminal de las subunidades $G\alpha$, en azul otras regiones de interacción con las $G\alpha$ y en verde los aminoácidos de interacción con el dímero $G\beta\gamma$. En el EC-2 se indica la formación de un puente disulfuro entre dos cisteínas. Adaptado de Mukhopadhyay y col., (2002).

La alta especificidad de los GPCR les permite discriminar entre la gran variedad de señales extracelulares para las que están diseñados. Estos receptores responden a una amplia diversidad de ligandos tanto endógenos (hormonas, neurotransmisores peptídicos, aminas, factores de crecimiento) como exógenos (fármacos, drogas, toxinas) (Marinissen y Gutkind, 2001).

Los GPCR son moléculas lineales transmembrana que llevan a cabo la mayoría de sus acciones intracelulares a través de rutas de señalización que implican la activación inicial de proteínas G. Su topología de membrana es común, y se caracteriza por la disposición extracelular de su extremo amino, el extremo carboxilo intracelular y siete regiones transmembrana (TM1-TM7) conectadas por bucles. Las secuencias aminoacídicas de estos receptores G comparten un 60 % de identidad, siendo las regiones transmembrana las zonas más conservadas (73 - 76 % de homología) y las extracelulares las de mayor variabilidad (34 - 40 % de identidad) (Figura 4).

En estado basal, los GPCRs se encuentran asociados a proteínas G heterotriméricas formadas por las subunidades α , β y γ . La subunidad $G\alpha$, que es la que se acopla al receptor G, lleva unida una molécula de guanósín difosfato (GDP), y el dímero $G\beta\gamma$ está unido a la subunidad $G\alpha$. Se han identificado 23 proteínas $G\alpha$, 5 $G\beta$ y 12 $G\gamma$ (Downes y Gautman, 1999). Aunque podrían existir muchas combinaciones de heterotrimeros, parecen existir una serie de combinaciones preferidas limitándose así el número de posibles formaciones (Robillard y col., 2000; Albert y Robillard, 2002).

Las subunidades $G\alpha$ están formadas por dos dominios: un dominio Ras o dominio GTPasa, común a todas las proteínas de la familia de las GTPasas, responsable de la hidrólisis de nucleótidos de guanina; y un dominio helicoidal de mayor variabilidad en el extremo carboxilo terminal. La clasificación de las $G\alpha$ engloba cuatro grupos en función de la similitud de secuencia: $G\alpha_s$, que incluye $G\alpha_s$ y $G\alpha_{olf}$; $G\alpha_i$, que agrupa las subunidades $G\alpha_{i1/i2/i3}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_{t1/t2/t3}$ y $G\alpha_z$; $G\alpha_q$, que incluye $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ y $G\alpha_{15}$; y $G\alpha_{12}$, que comprende las proteínas $G\alpha_{12}$ y $G\alpha_{13}$ (Downes y Gautman, 1999).

El ciclo de activación/desactivación de las proteínas G se describe en la Figura 5. En situación basal el GPCR está unido a la proteína G heterotrimérica inactiva, en la que la subunidad $G\alpha$ tiene unida una molécula de GDP (paso 1). La unión de un agonista al receptor G provoca un cambio conformacional en él, que se transmite a la estructura de la $G\alpha$, favoreciéndose el intercambio del GDP por una molécula de guanósín trifosfato (GTP)

(paso 2). La unión del GTP a la $G\alpha$ desestabiliza el complejo permitiendo la separación de la proteína G del receptor y, que la subunidad $G\alpha$ -GTP, por una parte, y el dímero $G\beta\gamma$ por otra, puedan unirse a sus efectores (paso 3), entre los que se encuentran adenilato ciclasas, guanilato ciclasas, canales de Ca^{2+} , fosfolipasa A2 (PLA₂), fosfolipasa C (PLC), etc. La regulación de los efectores promueve o inhibe la síntesis de una serie de segundos mensajeros como el adenosín monofosfato cíclico (AMPc), diacilglicerol (DAG), inositol 3,4,5-trifosfato (IP3), etc. La señalización termina con la hidrólisis del GTP a GDP por la actividad intrínseca de la $G\alpha$, que puede ser catalizada por una proteína reguladora de la señalización de proteínas G (RGS) (paso 4) (McIntire, 2009).

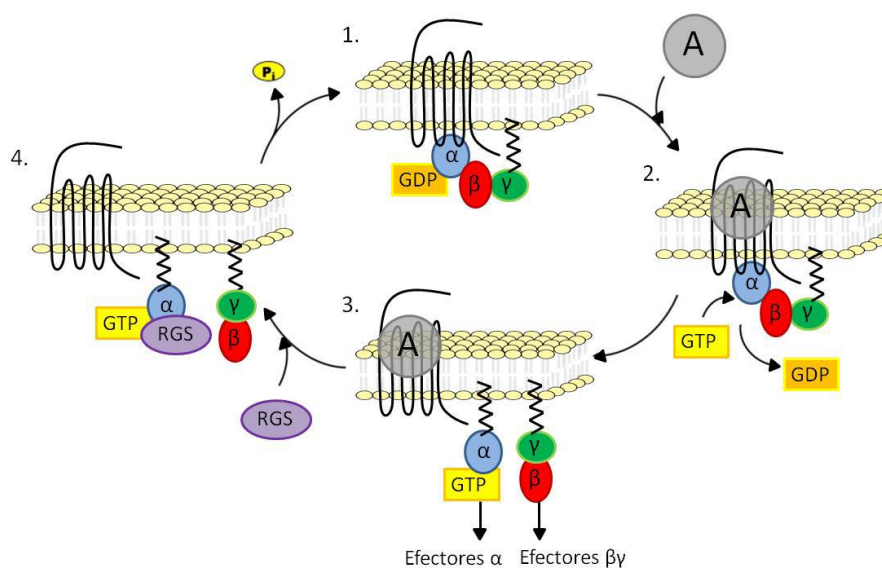


Figura 5. Ciclo de activación/desactivación de las proteínas G. El agonista se representa con un círculo gris y una A.

Las RGS son una gran familia de proteínas identificadas inicialmente por su capacidad de acelerar la función GTPasa (GAP) de las subunidades $G\alpha$ de los GPCRs, incrementando la tasa de hidrólisis de GTP hasta 100 veces. Este proceso acorta drásticamente la vida útil de $G\alpha$ -GTP y del dímero $G\beta\gamma$, resultando en una regulación negativa de la señalización de los GPCR y, por tanto, evitando la desensibilización de los efectores ante nuevas situaciones mediadas por estos GPCRs (Senese y col., 2020). Existe una especificidad de las diferentes proteínas RGS hacia determinados tipos de subunidad $G\alpha$ a la que se unen, habiéndose descrito interacciones preferentes.

Los miembros de la familia RGS poseen una región altamente conservada de aproximadamente 120 aminoácidos, conocida como el dominio RGS u homólogo-RGS

(RH), responsable de su capacidad GAP. Se han descrito 30 proteínas RGS en mamíferos que se agrupan en 7 subfamilias: A/RZ, B/R4, C/R7, D/R12, E/RA, F/GEF, G/GRK en función de la secuencia aminoacídica de sus dominios RGS y de los dominios adicionales que presenten (O'Brien y col., 2019). Estos otros dominios les permiten interactuar con diferentes moléculas reguladoras, integrando vías de señalización independientes o movilizándose a diferentes entornos celulares (Tabla 2).








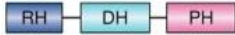

Subfamilia	Miembros	Especificidad de proteínas $G\alpha$	Dominios relevantes
A/RZ	RGS17 (Z2), 19 (GAIP), RGS20 (Z1)	Gi, Gz, Gq	
B/R4	RGS1, 2, 4, 5, 8, 13, 16, 18, 21	Gi, Gq	
	RGS3	Gi, Gq	
C/R7	RGS6, 7, 9, 11	Go	
D/R12	RGS10, 12, 14	Gi	
E/RA	Axina	Sin actividad GTPasa	
	Axina2		
F/GEF	P115-RhoGEF, GRK2, RGS22	Gq	
G/GRK	GRK1, 4, 5, 6, 7	Sin actividad GTPasa	

Tabla 2. Estructura y clasificación de las proteínas RGS de mamíferos. Las proteínas están orientadas con su extremo amino a la izquierda y carboxilo a la derecha, y están clasificadas según el alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio RGS. *Cys*, dominio rico en cisteínas; *RH*, dominio homólogo-RGS; *PDZ*, PSD-95/Dgl/ZO-1; *DEP*, dominio *Dishevelled*/EGL-10/pleckstrina; *GGL*, dominio tipo proteína G-gamma; *PTB*, dominio de unión a fosfotirosina; *RBD*, dominio unión a Ras; *GoLoco*, motivo regulador de proteínas G; *beta-cat*, dominio de unión a beta-catenina; *GSK3beta*, dominio de unión a GSK3beta; *DAX*, dominio presente en axina; *DH*, dominio homólogo Dbl; *PH*, dominio homólogo pleckstrina. Adaptado de O'Brien y col., (2019).

La mayoría de las proteínas RGS se unen preferentemente a las subunidades $G\alpha$ en estado de transición de hidrólisis de GTP, en el que la $G\alpha$ -GTPasa ya ha iniciado la conversión de GTP a GDP (Berman y col., 1996). La unión de las subunidades activas $G\alpha$ -GTP con sus efectores induce este estado de transición, de modo que las proteínas $G\alpha$ pueden regular a sus efectores antes de que las RGS promuevan su desactivación. Por el contrario, los miembros de la subfamilia RGS-RZ se unen con afinidad similar a proteínas

G α en estado activado (G α -GTP) o en estado de transición (Wang y col., 1998). La capacidad de unión de las RGS-RZ a las subunidades G α -GTP sugiere que estas proteínas reguladoras podrían reducir la activación de efectores mediada por las G α . De hecho, en las subunidades G α z se inicia muy tardíamente su actividad GTPasa, por lo que la unión de la RGS-RZ a la subunidad G α z-GTP evitan la desensibilización de sus efectores (Hepler y col., 1997; Garzón y col., 2005a).

3.1.1. Receptor opioide Mu (MOR)

La investigación desarrollada alrededor de la morfina y sus derivados confirmó la existencia de receptores específicos para estos compuestos: los receptores opioides. Los estudios de unión de radioligandos permitieron diferenciar tres tipos de receptores opioides, designados en función de las iniciales de los agonistas empleados: Mu o MOR (por morfina), Kappa o KOR (por ketaciclazocina) y Sigma (por SKF10.047 o N-alilmetazocina) (Martin y col., 1976). Poco después, se incluyó otro receptor opioide, llamado Delta o DOR (en alusión al conducto deferente de ratón, donde se descubrió) (Lord y col., 1977). Posteriormente, se excluyó al receptor Sigma de la familia de receptores opioides, al no adaptarse a la estructura típica de éstos y no presentar una regulación por proteínas G (Hanner y col., 1996; Pan y col., 1998).

Desde el punto de vista farmacológico, el uso de diferentes ligandos agonistas y antagonistas permitió identificar subtipos de los tres receptores opioides; se han descrito 3 subpoblaciones para el MOR (MOR1, MOR2 y MOR3) (Gintzler y Pasternak, 1983; Pasternak y Wood, 1986; Stefano y col., 1993; Makman y col., 1995), 2 para el DOR (DOR1 y DOR2) (Jiang y col., 1991; Sofuoglu y col., 1991; Stewart y Hammond, 1993) y 3 para el KOR (KOR1, KOR2 y KOR3) (Morre y col., 1983; Castanas y col., 1984; Clark y col., 1989).

A nivel de genoma, únicamente se ha clonado un gen que codifica para el MOR (Figura 6) (Chen y col., 1993; Min y col., 1994; Wang y col., 1994), otro para el DOR (Fukuda y col., 1993; Knapp y col., 1994), y un tercero para el KOR (Nishi y col., 1993; Yasuda y col., 1993; Mansson y col., 1994). Esto abre la posibilidad de que los receptores farmacológicos se originen en lecturas alternativas de los correspondientes genes y/o en su acoplamiento con otras proteínas que puedan proporcionar cambios en el sitio de unión de los ligandos. Se han descrito más variantes de los receptores opioides, generadas por la

lectura alternativa de sus genes; en concreto, el MOR, principal responsable de la analgesia opioide supraespinal, consta de 28 variantes de las cuales 15 difieren estructuralmente en el extremo carboxilo terminal del receptor, una región importante para la transducción de la señal tras la activación del receptor (Pasternak y Pan, 2013).

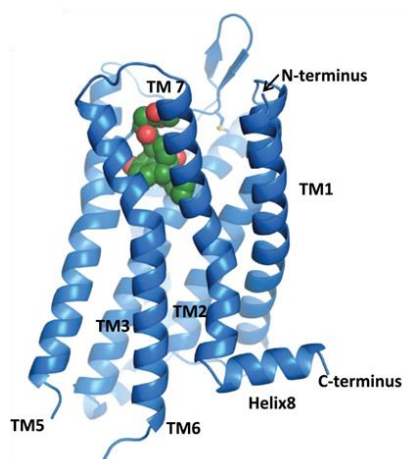


Figura 6. Estructura cristalográfica del MOR. Vista lateral del MOR con el antagonista β -funaltrexamina unida covalentemente. En la configuración del bolsillo de unión están involucradas las regiones TM3, TM5, TM6 y TM7. Los extremos amino y carboxilo terminal aparecen truncados. Adaptado de Pasternak y Pan (2013).

El MOR está ampliamente distribuido en prosencéfalo, mesencéfalo y metencéfalo. Se encuentra en alta densidad en neocórtex, caudado-putamen, núcleo accumbens, tálamo, hipocampo, amígdala, tubérculo cuadrigémino superior e inferior, núcleo del tracto solitario, núcleo trigémino espinal y asta dorsal (Mansour y col., 1988). Debido a su papel en la regulación de la nocicepción, este receptor está presente en todos los componentes conocidos del circuito de modulación del dolor: corteza insular, amígdala, hipotálamo, sustancia gris periacueductal (PAG), tegmento pontino dorsolateral, médula espinal ventromedial y asta dorsal (Mansour y col., 1988; Arvidsson y col., 1995; Mansour y col., 1995; Akil y col., 1998). Los receptores opioides se expresan también a nivel del sistema nervioso periférico modulando diversas funciones fisiológicas: se localizan en fibras nerviosas sensoriales y simpáticas de la piel y de las articulaciones, en los plexos del intestino, en la vejiga urinaria y los conductos deferentes, en las células endocrinas y en el sistema inmune (Stein, 1993; Puig y Montes, 1998).

3.1.1.1. Efectos farmacológicos de la activación del MOR

La activación de los receptores opioides produce numerosos efectos fisiológicos tales como la disminución de la motilidad intestinal, náuseas, vómitos, miosis, bradicardia, euforia, sedación, hipotermia, depresión respiratoria, etc. Entre todas las funciones del

sistema opioide, el control del dolor destaca desde el punto de vista terapéutico. Los agonistas exógenos de los receptores opioides producen analgesia, existiendo además un tono opioide endógeno que regula la información nociceptiva. La amplia distribución del sistema opioide en el organismo le permite controlar la nocicepción tanto a nivel periférico como central. En este sentido, el sistema opioide actúa sobre el sistema aferente en el SNC, integrando los estímulos dolorosos que llegan de la periferia, y sobre el sistema eferente, que regula la transmisión de la sensación nociceptiva a la médula espinal.

De acuerdo con su origen, el dolor puede dividirse en: dolor neuropático, ocasionado por una lesión directa sobre el sistema nervioso; y dolor nociceptivo o inflamatorio, que aparece cuando un estímulo potencialmente dañino estimula los receptores nociceptivos periféricos somáticos o viscerales (superficiales o profundos) de cualquier parte del cuerpo que no pertenezca al SNC. Los fármacos opioides son útiles principalmente en el tratamiento del dolor de moderada-alta intensidad, tanto agudo como crónico. Del conjunto de fármacos opiáceos, la morfina, que activa al MOR, es el fármaco prototipo y el más utilizado en la clínica del dolor.

El tipo de estímulo nociceptivo determina el tipo de receptor opioide implicado en la respuesta analgésica. Los ratones KO del MOR manifiestan una mayor sensibilidad al calor que los ratones deficientes de DOR y KOR (Kieffer y Gaveriaux-Ruff, 2002). Por otro lado, los agonistas de los receptores MOR y KOR reducen los reflejos producidos por estímulos dolorosos térmicos y mecánicos con igual intensidad y de forma dosis dependiente (Parsons y Headley, 1989). Sin embargo, únicamente los agonistas del MOR tienen un papel significativo en la nocicepción visceral inducida por distensión colorrectal (Harada y col., 1995).

La activación persistente de los receptores de NMDA es responsable de los cambios neurales que aparecen en diferentes variantes del dolor neuropático, como la neuropatía diabética, la neuralgia post-herpética, el dolor inflamatorio crónico o la neuropatía en pacientes con cáncer. En estas circunstancias, la administración de opioides como la morfina proporciona un alivio limitado del dolor (Chapman y col., 1994; Sigtermans y col., 2009). Por tanto, para tratar el dolor neuropático se necesitan dosis de opioides significativamente más elevadas que aquellas que son eficaces en el tratamiento del dolor nociceptivo, e incluso así su eficacia es tan solo parcial. Este hecho se debe a que la respuesta analgésica a la morfina se encuentra bajo la regulación funcional negativa de la cascada NMDAR/nNOS (Inoue y col., 2003; Rodríguez-Muñoz y col., 2008). En este

sentido, la administración de antagonistas del NMDAR mejora o prolonga la analgesia opioide en humanos y remite la alodinia táctil y la hiperalgesia características del dolor neuropático (Mizoguchi y col., 2009). No obstante, estas drogas provocan una serie de efectos adversos que incluyen somnolencia, alucinaciones o coma, imposibilitando su uso prolongado en clínica (Palmer, 2001). Por este motivo, los opioides se combinan normalmente con antidepresivos, anticonvulsivantes, y bloqueantes de canales de sodio, que aumentan su eficacia (Mizoguchi y col., 2009).

Aparte de la analgesia, los opioides producen efectos farmacológicos variados. La reducción en la motilidad intestinal y la depresión respiratoria son los principales efectos adversos que aparecen por el uso de los opioides. La administración de antagonistas de efecto periférico como la metilnaltrexona y el alvimopan han solucionado estos problemas. El prurito es otro efecto secundario muy habitual de la morfina, principalmente cuando se administra por inyección epidural. Por otro lado, los opioides alteran el sistema endocrino, aumentando la liberación de prolactina y hormona del crecimiento, y disminuyendo los niveles de testosterona. Además, la administración crónica de opioides provoca pérdida de tono muscular, disfunción sexual y efectos psicológicos (Spiegel y col., 1982; Pasternak y Pan, 2013).

3.1.1.2. Señalización del MOR

La activación de los receptores opioides conduce a la inhibición de la adenilato ciclasa, la modulación de canales de Ca^{2+} y la estimulación de canales de K^+ (Figura 7). Los agonistas opioides muestran distinta afinidad por el MOR en función del tipo de $\text{G}\alpha$ al que esté acoplado (Garzón y col., 1998; Stanasila y col., 2000; Massotte y col., 2002), y este acoplamiento va a determinar el patrón de activación de las proteínas G. La señalización supraespinal del MOR está estrechamente ligada a la $\text{G}\alpha_z$ (Sánchez-Blázquez y col., 2001).

En determinadas circunstancias, la activación de receptores opioides puede producir el incremento de los niveles de AMPc por estimulación de la adenilato ciclasa (Chan y col., 1995). En otros casos, la estimulación del receptor por un agonista provoca la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares, mediante la activación de la PLC que induce la formación de los mensajeros IP3 y DAG (Smart y Lambert, 1996; Smart y col., 1997; Law y col., 2000).

Los opioides también son capaces de activar a la PKC (Williams y col., 2001), activar la cascada de las quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (Yoburn y col., 2003), de controlar la proteína quinasa B (PKB/AKT) (New y col., 2007), regular los activadores específicos de la función GTPasa de los Rap1 (Meng y col., 1999; Mochizuki y col., 1999; Jordan y col., 1999) y modular la tirosina quinasa Src (Ma y col., 2000).

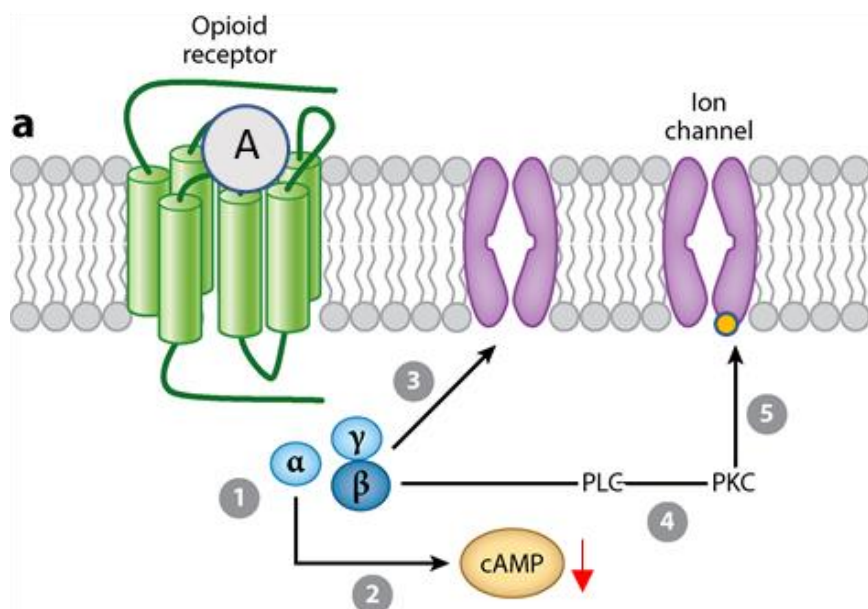


Figura 7. Señalización de los receptores opioides. El agonista (A) opioide induce un cambio conformacional en el receptor que (1) induce el desacoplamiento y disociación de la proteína G heterotrimérica. (2) La subunidad G α activada puede inhibir la adenilato ciclasa y reducir los niveles de AMPc. (3) El dímero G $\beta\gamma$ reduce la conductancia de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje o estimula los canales de K⁺. (4) Además, se puede activar la ruta de PLC/PKC, modulando la actividad de los canales de calcio de la membrana plasmática (5). Adaptado de Stein (2016).

3.1.1.3. Mecanismos de regulación de la señalización de los receptores opioides: desensibilización y tolerancia

El uso de los opioides está muy controlado debido a su naturaleza adictiva y, sobre todo, al riesgo de producir tolerancia. La administración repetida de estas drogas provoca una disminución progresiva de su potencia, necesiéndose dosis más altas para conseguir el mismo efecto. Este hecho aumenta el riesgo de exacerbar los efectos adversos de los opioides como la depresión respiratoria y los cambios cognitivos, así como la probabilidad de desarrollar dependencia física y psíquica. En modelos animales, la tolerancia a los efectos antinociceptivos de los opioides se ha detectado incluso tras la administración de una única dosis (Kornetsky y Bain, 1968; Huidobro y col., 1976), y su administración a largo plazo no sólo produce una profunda tolerancia sino también dependencia física.

Actualmente se conocen varios mecanismos moleculares que subyacen a la tolerancia a los opioides, lo que permite retrasar su aparición cuando se emplean en clínica.

En sistemas celulares, los receptores opioides activados por agonistas se internalizan en vesículas recubiertas de clatrina tras su fosforilación por las quinasas de receptores G (GRKs) y posterior unión de las β -arrestinas (Arden y col., 1995; Trapaidze y col., 1996; Li y col., 1999). La eficacia de los agonistas opioides para estimular la endocitosis del MOR difiere dependiendo de su capacidad para promover la fosforilación del receptor en residuos citosólicos mediante las GRKs (Zhang y col., 1998; Koch y col., 2001). En este sentido, la morfina induce un alto grado de desensibilización antinociceptiva al producir poca fosforilación e internalización de los MORs (Finn y Whistler, 2001; Rodríguez-Muñoz y col., 2007b). Por el contrario, otros agonistas opioides, como DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol⁵]-encefalina), promueven eficientemente la endocitosis, defosforilación citosólica y re inserción del MOR en la membrana plasmática, lo que da lugar a una tolerancia analgésica moderada (Koch y col., 2005).

Cuando los agonistas no son capaces de desencadenar la fosforilación del receptor y éste no se internaliza, se activan otros mecanismos para regular la actividad del MOR. Nuestro grupo ha descrito que la tolerancia a morfina administrada por vía intracerebroventricular (icv) se induce por la transferencia estable de las subunidades $G\alpha$ activadas por el MOR a proteínas RGS de las subfamilias R7 y RZ, aumentando el número de dímeros $G\beta\gamma$ libres en las proximidades del receptor (Garzón y col., 2005b; Rodríguez-Muñoz y col., 2007a). La interacción persistente entre las proteínas RGS y las $G\alpha$ está facilitada por modificaciones post-traduccionales de las RGS que evitan su función GAP, como la fosforilación de residuos de serina en el dominio RGS de las proteínas RGS-R7 (Garzón y col., 2005b) y la sumoilación del dominio RGS de las RGS-RZ (Rodríguez-Muñoz y col., 2007a).

A nivel de efectores, la activación persistente del MOR induce una regulación positiva de la adenilato ciclasa tipo dos, y una disminución de la actividad de las fosfodiesterasas encargadas de degradar el AMPc (Law y col., 2000); se desensibilizan los canales de K^+ (Kovoor y col., 1995); aumenta la expresión de canales de Ca^{2+} tipo L en animales tolerantes (Ohnishi y col., 1990; Welch y Olson, 1991; Smith y col., 1999a); y aumenta la participación de la vía IP₃/DAG (Smith y col., 1999b).

3.2. Receptores NMDA

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC de mamíferos, actuando tanto sobre receptores ionotrópicos como metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos de glutamato se clasifican en tres familias en función de su comportamiento farmacológico: *N*-metil-D-aspartico (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) y kainato. Estos receptores ionotrópicos están constituidos por cuatro o cinco subunidades que son específicas para cada una de las tres familias, y conforman canales iónicos que son permeables a cationes, aunque su permeabilidad a iones Na^+ y Ca^{2+} varía en función de la familia y de las subunidades que integren al receptor (Laube y col., 1998; Dingledine y Conn, 2000; Lutz y Castillo, 2020).

3.2.1. Estructura

Los NMDARs son complejos formados por diferentes combinaciones de tres tipos de subunidades: NR1, NR2 y NR3. Hay ocho subunidades NR1 distintas generadas por lecturas alternativas de un único gen, cuatro subunidades NR2 (A, B, C y D) y dos NR3 (A y B); las variantes de las subunidades NR2 y NR3 se codifican cada una por un gen distinto (Dingledine y col., 1999). La subunidad NR1 es ubicua en el SNC durante toda la vida. Sin embargo, el patrón de expresión de las distintas subunidades NR2 varía en función de la región cerebral y del momento de desarrollo del SNC. Las subunidades NR2A y 2B se localizan principalmente en el cerebro anterior, mientras que la NR2C se encuentra en el cerebelo y bulbo olfatorio, y la NR2D está en regiones subcorticales y el mesencéfalo (Hardingham, 2019). De igual modo, las subunidades NR2B y NR2D predominan en el cerebro fetal y su expresión se reduce conforme avanza el desarrollo, mientras que los niveles de NR2A aumentan tras el nacimiento (Monyer y col., 1994; Sheng y col., 1994; Wenzel y col., 1997; Liu y col., 2004). Respecto a la subunidad NR3A, su expresión es muy notable durante el periodo inmediatamente postnatal y la NR3B se localiza principalmente en las neuronas motoras adultas (Paoletti y col., 2013).

Los receptores de NMDA son tetrámeros constituidos mayoritariamente por dos subunidades NR1 obligatorias y dos subunidades NR2 (Chatterton y col., 2002; Madry y col., 2007; Lutz y Castillo, 2020). En distintas áreas cerebrales y en subpoblaciones neuronales específicas se han encontrado NMDARs triheteroméricos constituidos por una combinación de NR1 con diferentes variantes de NR2 o NR3, incluso la combinación

NR1/NR2/NR3 (Sheng y col., 1994; Chazot y Stephenson, 1997; Pérez-Otano y col., 2001; Chatterton y col., 2002; Sasaki y col., 2002; Hatton y Paoletti, 2005; Low y Wee, 2010). La composición de subunidades del receptor determina sus propiedades funcionales. Cada subunidad presenta diferentes motivos intra- y extracelulares susceptibles de experimentar modificaciones post-traduccionales que, a su vez, van a cambiar las propiedades del receptor de NMDA: sus niveles de expresión, su localización sináptica y la interacción con otros componentes celulares (Kotecha y MacDonald, 2003; Traynelis y col., 2010; Lutz y Castillo, 2020).

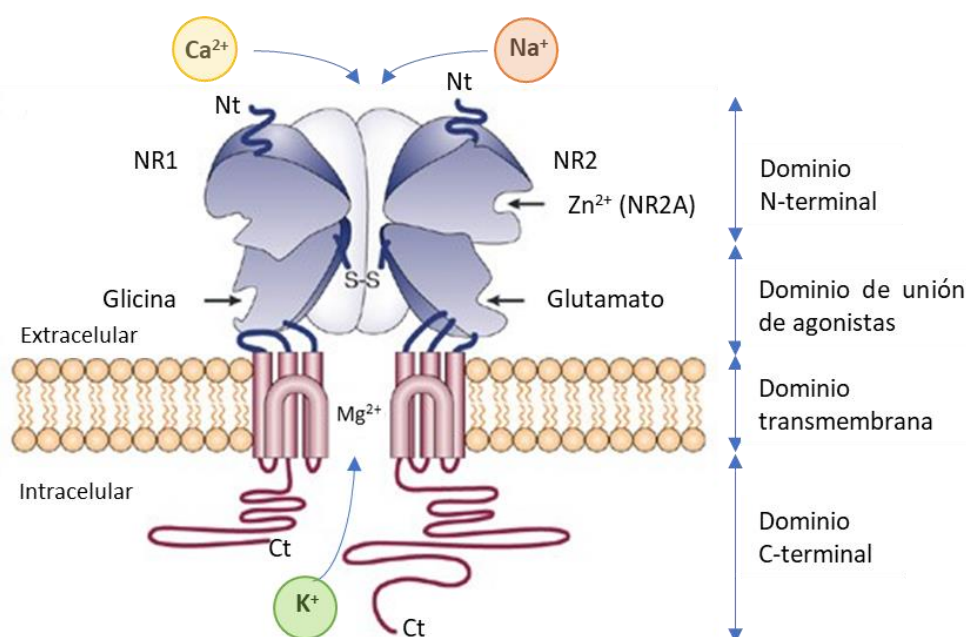


Figura 8. Topología de las subunidades del NMDAR. Una subunidad del NMDAR consta de un largo extremo amino compuesto por los dominios N-terminal y de unión a agonistas, los cuatro segmentos transmembrana y el dominio C-terminal citoplasmático. Adaptado de Kemp y McKernan (2002).

Las subunidades del NMDAR comparten una topología de membrana común que se caracteriza por un largo extremo amino extracelular, cuatro dominios transmembrana que forman el canal iónico y un extremo carboxilo intracelular (Figura 8). La región extracelular es importante en el ensamblaje de las subunidades e incluye un dominio de unión a agonistas: glutamato en las subunidades NR2, y glicina (o D-serina) en NR1 y NR3. Además, el dominio N-terminal de las subunidades NR2 contiene sitios de unión de inhibidores alostéricos, como zinc e ifenprodil (Meddows y col., 2001; Furukawa y col., 2005). Todas las subunidades constan de un segundo dominio transmembrana con forma

de horquilla, que atraviesa parcialmente la membrana y confiere selectividad iónica al canal.

El tamaño del extremo carboxilo varía en función de la subunidad y, a través de él, se establecen múltiples interacciones con proteínas de andamiaje y señalización de la densidad postináptica, generándose los complejos multiproteicos de los NMDARs. Entre las proteínas que conforman estos complejos destacan la calmodulina, proteínas quinasas y fosfatasas, que regulan el tráfico del receptor, su localización y la señalización intracelular. Además, el dominio C-terminal es el único que no está afectado por moduladores alostéricos (Dingledine y col., 1999). La amplia divergencia que existe en las regiones amino y carboxilo terminales de las subunidades aporta una gran diversidad funcional entre los receptores (Paoletti y col., 2013).

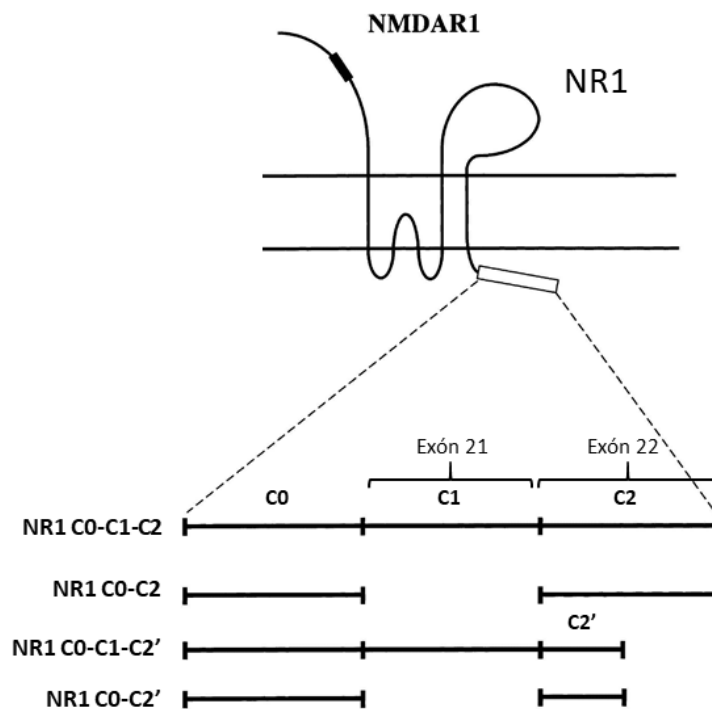


Figura 9. Diversidad del dominio C-terminal de la subunidad NR1. Las diferentes isoformas se generan por la lectura alternativa de los exones 21 y 22, dando lugar a las regiones C1, C2 y C2'. Adaptado de Standley y col., (2000).

La subunidad NR1 presenta 8 isoformas distintas generadas por la lectura alternativa de los exones 5, 21 y 22 del gen. El exón 5 codifica para una región de 21 aminoácidos del dominio N-terminal de la NR1. El procesamiento diferencial de los exones 21 y 22 da lugar a cambios en el extremo carboxilo de la subunidad (dominios C1, C2 y C2'). De este modo,

la cola citosólica de la subunidad NR1 consta siempre del dominio C0 (más próximo a membrana), que puede ir seguido del dominio C1 y del C2/C2', siendo C2/C2' alternativos entre sí, al resultar ambos del procesamiento diferencial del exón 22 (Figura 9) (Zukin y Bennett, 1995).

Los cambios en la región citosólica del NMDAR tienen un papel importante en la regulación y localización del receptor en la membrana. De este modo, el exón 21 incluye residuos de serina susceptibles de fosforilación por la PKC y la PKA, que están involucrados en la regulación positiva de la NR1 en respuesta a glutamato (Tingley y col., 1993; Tingley y col., 1997). Además, esta región C1, junto con C0 en menor medida, es la región por la que el receptor de NMDA interacciona con la CaM, que modula negativamente la actividad del canal (Ehlers y col., 1996; Ataman y col., 2007).

3.2.2. Activación y desactivación del receptor

El receptor de NMDA presenta una cinética de activación lenta con respecto al AMPAR como consecuencia de su marcada dependencia de voltaje. La activación del NMDAR requiere de 3 eventos simultáneos: (i) la despolarización prolongada de la membrana postsináptica, habitualmente por la activación de los receptores AMPA, que permite la eliminación del bloqueo por iones magnesio en el poro del NMDAR; (ii) la unión de glicina o D-serina en el sitio de unión de la subunidad NR1; (iii) la unión del glutamato a su sitio en la subunidad NR2. De este modo, se permite la apertura del canal y la entrada de calcio y sodio al interior celular, y la salida de iones potasio (Seeburg y col., 1995).

El tipo de subunidad NR2 presente en el receptor determina varias de las propiedades de apertura del canal, incluyendo la probabilidad de máxima apertura, la sensibilidad a agonistas y la cinética de desactivación. En este sentido, la subunidad NR2A manifiesta una menor sensibilidad a los agonistas glutamato y glicina, pero aporta una mayor probabilidad de apertura del canal que cualquier otra subunidad NR2 (Paoletti y col., 2013). Por este motivo, los receptores NR1/NR2A son esenciales para la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) mientras que la subunidad NR2B se ha relacionado más con la depresión a largo plazo (LTD) (Sakimura y col., 1995; Brigman y col., 2010; Paoletti y col., 2013).

Los NMDARs se organizan en grandes complejos de señalización macromolecular constituidos por proteínas adaptadoras y de anclaje. La apertura de estos receptores de

glutamato conlleva un aumento de los niveles intracelulares de calcio, lo cual induce una cascada de señalización. En consecuencia, se producen cambios locales de plasticidad sináptica, como la inserción de nuevos receptores AMPA en membrana, reforzándose así la transmisión sináptica (Song y Huganir, 2002). Además, la señalización mediada por el NMDAR modifica la expresión génica y conduce a cambios estructurales a largo plazo, afectando al desarrollo de las sinapsis y su maduración (Greer y Greenberg, 2008).

El aumento del calcio intracelular activa a la CaM, que se une a diferentes proteínas modulando su actividad, entre ellas, al NMDAR, al que regula negativamente. La CaM es una proteína pequeña de 149 aminoácidos, formada por una única cadena polipeptídica que se estructura en dos regiones globulares en los extremos amino y carboxilo terminales, unidas entre sí por una hélice alfa muy flexible, que permite a la proteína adquirir diferentes conformaciones. Cada una de las zonas globulares presenta dos dominios “mano EF” de unión a calcio, siendo más afines las dos manos del extremo C-terminal (James y col., 1995). Los dos lóbulos de la CaM actúan como sensores independientes de calcio, decodificando diferentes señales y siendo el origen mecánico de la regulación específica de ciertos canales de calcio tipo P/Q. Así, en función de los diferentes niveles intracelulares de calcio, éste se une a una o a las dos regiones de la CaM, induciendo una configuración u otra, lo que determina la interacción de la proteína con diferentes canales como los canales de pequeña conductancia de K⁺, los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, etc., (Xia y col., 1998; DeMaria y col., 2001; Ben-Johny y col., 2015).

3.2.3. Distribución y localización anatómica

Los receptores de NMDA se han localizado principalmente en las terminales postsinápticas de las sinapsis glutamatérgicas de diferentes estructuras del SNC. A nivel espinal, estos receptores se expresan en la sustancia gelatinosa del asta dorsal con una presencia limitada en otras zonas de la sustancia gris (Kalb y Fox, 1997). A nivel supraespinal, los NMDARs están en hipocampo, corteza cerebral, tálamo, estriado, cerebelo y tronco del encéfalo (Dohrn y Beitz, 1994; Petralia y col., 1994a; Petralia y col., 1994b; Tolle y col., 1995; Bonnot y col., 1996).

Los estudios anatómicos han revelado que los patrones de distribución del MOR y del NMDAR son similares en muchas regiones del SNC. Estos dos receptores colocalizan dentro de las mismas neuronas del SNC, destacando el núcleo caudado-putamen, la corteza

del núcleo accumbens, el núcleo del tracto solitario y el núcleo habenular del tálamo (Gracy y col., 1997; Wang y col., 1999; Aicher y col., 2000; Narita y col., 2008). Concretamente, en las dendritas y soma de las neuronas del PAG ventrolateral existe una fuerte colocalización MOR-NMDAR (Commons y col., 1999; Narita y col., 2008). Los resultados indican de forma convincente que el MOR y el NMDAR coexisten en ciertas postsinapsis y que ambos receptores interactúan dentro de la neurona (Rodríguez-Muñoz y col., 2012).

3.2.4. Patologías asociadas al NMDAR

Los receptores ionotrópicos de glutamato son mediadores esenciales de la plasticidad cerebral, convirtiendo patrones específicos de actividad neuronal en cambios a largo plazo en la estructura y función de las sinapsis. Por ello, en el SNC los NMDARs juegan un papel muy importante en la maduración dendrítica, la correcta sinaptogénesis, la plasticidad neuronal, la diferenciación, el aprendizaje y la consolidación de la memoria (Nakazawa y col., 2004).

La desregulación del sistema glutamatérgico se ha asociado con múltiples trastornos neuropsiquiátricos que cursan con defectos sinápticos. En concreto, la disfunción del NMDAR a causa de una alteración en la expresión, tráfico, localización o actividad de las subunidades, puede contribuir a ciertas condiciones patológicas. De este modo, se ha descrito la alteración del receptor de NMDA en diversos desórdenes neurológicos como el dolor crónico, Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, depresión, autismo, esquizofrenia, accidentes cerebrovasculares e isquemia (Kotecha y MacDonald, 2003; Lipton, 2006; Paoletti y col., 2013). No sólo la hiperactividad del receptor de glutamato es deletérea, implicando un aumento del flujo de calcio que conduce a la muerte neuronal, sino que la hipofunción del NMDAR también es nociva. La implicación del receptor de NMDA en el dolor crónico se ha comentado previamente en el apartado 3.1.1.1.

La investigación sistemática de los últimos años ha debilitado la idea de que la causa primaria de la esquizofrenia sean las alteraciones en el desarrollo y la citoarquitectura del sistema nervioso. En la actualidad, gana peso la teoría de la participación del sistema glutamatérgico, implicando tanto a receptores metabotrópicos como ionotrópicos tipo NMDA, siendo la disfunción de estos últimos lo más relevante (Ongur y col., 2008;

Kantrowitz y Javitt, 2010; Nakazawa y Sapkota, 2020). En la esquizofrenia se observa hipofunción glutamatérgica asociada con hiperfunción de los receptores de dopamina tipo 2 en áreas subcorticales, mientras que esta situación se invierte en corteza prefrontal. Esta paradoja parece deberse a la hipofunción de receptores de NMDA con función inhibitoria sobre ciertas neuronas glutamatérgicas, que al faltarles este freno aumentan la liberación de glutamato en corteza prefrontal (Moghaddam y Javitt, 2012). Puesto que el glutamato sináptico que actúa en receptores metabotrópicos presinápticos inhibe la liberación de dopamina, el bloqueo (ketamina, PCP) o la hipofunción del NMDAR causan tanto la hiperfunción glutamatérgica como la hipofunción dopaminérgica de la corteza prefrontal (Jentsch y col., 1998; Coyle y col., 2003).

En apoyo de la teoría glutamatérgica, los antagonistas del NMDAR como fenciclidina, ketamina o dizocilpina exacerbaban los síntomas psicóticos. Además, ciertos genes potencialmente implicados en la esquizofrenia son reguladores de la transmisión glutamatérgica NMDAR (Harrison y Weinberger, 2005), y en estos pacientes existen alteraciones en el receptor de NMDA y proteínas asociadas (Kristiansen y col., 2007; Rodríguez-Muñoz y col., 2017). De hecho, los niveles de las subunidades NR1 con el segmento C1 citosólico, necesario para la interacción con los GPCRs, están elevados en corteza prefrontal de pacientes depresivos y reducidos en esquizofrénicos con respecto a pacientes control (Rodríguez-Muñoz y col., 2017).

Recientemente, la descripción de las encefalitis anti-NMDAR ha evidenciado por otra vía la hipofunción del receptor de glutamato en esquizofrenia. En esta patología los anticuerpos reconocen a los propios NMDARs del organismo, provocando su internalización desde la membrana plasmática. Esto causa síntomas psicóticos similares a los primeros episodios de la esquizofrenia, pudiendo diagnosticarse erróneamente como una esquizofrenia idiopática (Dalmau y col., 2011; Al-Diwani y col., 2019).

La ELA es una enfermedad neuromuscular caracterizada por la pérdida selectiva de motoneuronas que conduce irreversiblemente a la parálisis. Aunque la mayoría de los casos son esporádicos, aproximadamente un 10 % son familiares, donde se han identificado alteraciones genéticas responsables de la patología. Así, se ha encontrado mutado el gen que codifica para la enzima que degrada a la D-serina (Mitchell y col., 2010), hallándose altas concentraciones de D-serina en la médula espinal de pacientes esporádicos y en modelos animales de ELA (Sasabe y col., 2007). Los niveles elevados de esta molécula activan la autofagia, formándose agregados ubiquitinados y promoviéndose la apoptosis.

De acuerdo con esto, el uso de antagonistas del NMDAR específicos del sitio de unión de D-serina/glicina atenúan estos procesos en modelos celulares (Paul y de Belleruche, 2014). A nivel clínico, la administración de fármacos como la gaciclidina, un antagonista no competitivo de alta afinidad del NMDAR, retrasa el deterioro locomotor y mejora la supervivencia preservando el peso corporal (Gerber y col., 2013).

La muerte neuronal secundaria característica de los accidentes cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas se debe, principalmente, a procesos de excitotoxicidad. Este fenómeno es consecuencia de una excesiva liberación de glutamato desde las terminales presinápticas y los astrocitos, causando la sobreestimulación de los receptores de glutamato, especialmente del NMDAR. La estimulación de estos receptores provoca el aumento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , activándose la cascada isquémica que conduce a la muerte celular (Hardingham, 2019). Por este motivo, los tratamientos terapéuticos actuales de estas patologías incluyen el uso de antagonistas del NMDAR, con especial interés en aquellos específicos de la subunidad NR2B (Paoletti y col., 2013).

3.3. Receptores TRPs

La década de 1990 fue especialmente productiva en la identificación de múltiples receptores TRPs (del inglés *Transient Receptor Potential cation channels*), una familia de grandes proteínas transmembrana que forman canales iónicos permeables principalmente a calcio, y en menor medida a sodio y potasio.

Los TRPs son canales polimodales, activándose por múltiples estímulos: detectan cambios en el entorno, responden a la temperatura, presión, sustancias aromáticas, pronociceptivos o proalgésicos, feromonas, etc., pero también intervienen en la regulación del tono vascular y la nocicepción. Actualmente se conocen 28 receptores presentes en mamíferos, clasificados en seis subfamilias en función de su homología estructural (Figura 10): TRPC (clásicos o canónicos), TRPV (vainilloides), TRPM (melastatina), TRPA (ankirina), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina) (Emir, 2017).

Estos receptores TRPs están ampliamente distribuidos en el organismo, incluyendo el sistema nervioso central. A nivel celular, están presentes en la membrana plasmática, controlando los niveles intracelulares de calcio. Los receptores TRPs están constituidos por cuatro subunidades, habitualmente idénticas entre sí, aunque también se han descrito algunos heterotetrámeros. Cada subunidad presenta los extremos amino y carboxilo

terminales en el citosol, conectados por seis hélices transmembrana; las cuatro primeras forman el dominio sensible a voltaje, y las dos últimas el poro permeable a cationes (Cheng y col., 2010).

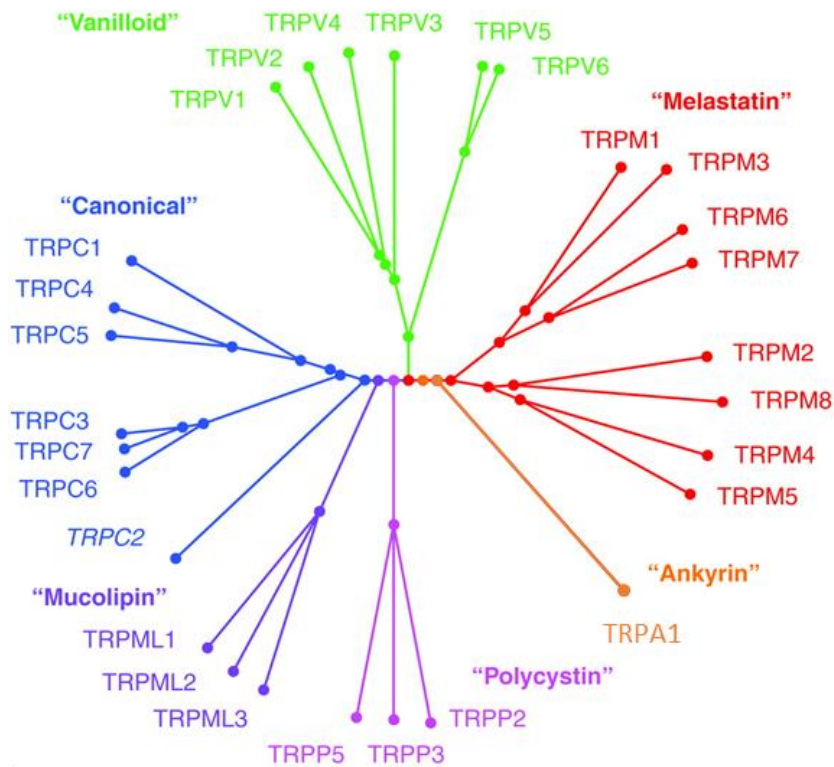


Figura 10. Árbol filogenético de la familia de canales iónicos TRPs descritos en mamíferos. Cada subfamilia está representada en un color. Adaptado de Gees y col., (2010).

En general, los receptores TRPs son canales iónicos dependientes de voltaje, aunque algunos, como el TRPV1, apenas responden a este parámetro (Liu y col., 2009). Esto se debe a la variabilidad aminoacídica de la cuarta hélice transmembrana que, en los canales muy dependientes de voltaje, como el TRPM8, es rica en residuos cargados positivamente (Voets y col., 2007). Los extremos amino y carboxilo terminal de los TRPs constan de diferentes dominios estructurales que varían entre las subfamilias, y modulan la función del canal y su tráfico intracelular. Tras la sexta hélice transmembrana, muy cercano a la membrana plasmática, se localiza el dominio TRP que da nombre a esta familia de proteínas (Figura 11). Esta región consiste en una hélice paralela a la membrana, y aunque su función no está clara, su posición le permite interactuar tanto con las regiones transmembrana como amino terminales (Emir, 2017). Únicamente tres subfamilias, TRPC, TRPV y TRPA, presentan un dominio con repeticiones de ankirina en número variable en la región amino terminal. La función de este dominio aún es controvertida, pero parece influir en la apertura

del canal (Salazar y col., 2008), y ser importante para la unión del ATP y la calmodulina (Rosenbaum y col., 2004; Lishko y col., 2007).

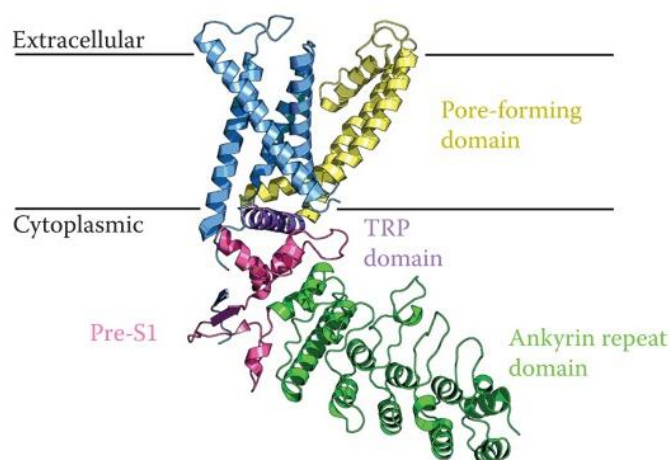


Figura 11. Representación esquemática en 3D del TRPV1 destacando varios dominios: en azul se marca el dominio sensible a voltaje, en amarillo el poro, en morado está el dominio TRP que da nombre a la familia, en rosa el dominio pre-S1 y en verde el dominio formado por varias repeticiones de anquirina. Adaptado de Emir, (2017).

Aunque en un primer momento los TRPs se estudiaron por su papel esencial en la fisiología sensorial, estudios recientes los han implicado en otras condiciones, tanto fisiológicas como patológicas: cáncer, procesos inflamatorios, fertilidad masculina, fisiología renal, salud cardíaca y desarrollo neuronal. Las alteraciones en los canales TRPs se han asociado con diversos trastornos como la enfermedad del hígado poliquístico, displasia esquelética y síndrome doloroso episódico familiar (Nilius, 2007). Por tanto, los canales TRP se consideran dianas terapéuticas de interés para el desarrollo de nuevos fármacos. En este estudio nos centramos en los canales TRPV1, TRPA1 y TRPM8 que actúan como detectores moleculares en las neuronas sensoriales de estímulos nocivos químicos y térmicos, que producen dolor agudo o crónico.

3.3.1. TRPV1

El TRPV1 es el primer miembro descrito de la familia TRPV, que consta de seis miembros (TRPV1-6) y cuyo nombre procede de la capsaicina, una molécula tipo vanilloide capaz de activar al TRPV1. Además, este receptor se activa por temperaturas superiores a 42 °C, moléculas endógenas derivadas de lípidos, soluciones ácidas y toxinas, siendo esencial para la nocicepción química y térmica (Caterina y col., 1997). No todos los

miembros de la familia TRPV responden a los mismos estímulos, ni presentan la misma selectividad al paso de cationes, a pesar de la alta homología de secuencia que existe entre ellos. De este modo, los receptores TRPV5 y TRPV6 son altamente específicos de calcio, mientras que TRPV1-4 son canales no selectivos, permitiendo el paso de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+ (Mohapatra y Nau, 2003; Ahern y col., 2005; Samanta y col., 2018).

Se ha descrito la presencia del TRPV1 tanto en neuronas como en otros tipos celulares. A nivel neuronal, este receptor se encuentra en las fibras C sensoriales no mielinizadas y en las fibras A δ débilmente mielinizadas, que proyectan a la mayoría de los órganos y tejidos (Caterina y col., 1997; Helliwell y col., 1998). También se localiza en el núcleo caudal del trigémino, el núcleo del tracto solitario y en dos poblaciones neuronales de la raíz dorsal de la médula espinal: en neuronas sensibles al factor de crecimiento nervioso y positivas para sustancia P, y en neuronas sensibles al factor neurotrófico derivado de la glía y que unen IB4 (Tominaga y col., 1998; Szallasi y Blumberg, 1999). La expresión del *TRPV1* depende de los niveles de estos dos factores de crecimiento; su ausencia provoca la reducción significativa de los niveles del receptor (Winter y col., 1988; Bevan y Winter 1995; Bron y col., 2003). Por el contrario, el aumento de los niveles de los factores neurotróficos que se produce en inflamación conlleva una sobreexpresión del *TRPV1*, y una mayor inserción del receptor en la membrana plasmática, contribuyendo todo ello a la hipersensibilidad térmica (Ji y col., 2002; Zhang y col., 2005; Malin y col., 2006; Camprubí-Robles y col., 2009).

A nivel cerebral, el TRPV1 está presente en el área preóptica del hipotálamo, esencial para las respuestas termorreguladoras que evitan la hipertermia (Jancso-Gabor y col., 1970; Szolcsanyi y col., 1971), la corteza entorrinal, el PAG, el núcleo supramamilar y el hipocampo (Cavanaugh y col., 2011). Además, fuera del sistema nervioso el receptor TRPV1 se ha encontrado en células del músculo liso arteriolar regulando la vasodilatación, en la piel, la tráquea y el cremáster (Kark y col., 2008; Cavanaugh y col., 2011).

Los estudios con quimeras entre canales con diferentes sensibilidades térmicas han mostrado que las regiones amino y carboxilo terminales son esenciales para la sensibilidad térmica del receptor. Así, la inserción del extremo amino terminal del TRPV1 en el canal TRPV2 (no sensible a temperatura) resulta en la generación de un receptor activado por altas temperaturas (Yao y col. 2011). De igual manera, los canales quiméricos con el C-terminal del TRPV1 reemplazado por el del TRPM8 son activados por frío y, por el contrario, los canales TRPM8 con el extremo carboxilo terminal del TRPV1 se activan por

altas temperaturas (Brauchi y col., 2006). Además, mutaciones puntuales o el truncamiento progresivo de la región C-terminal reduce la sensibilidad a la capsaicina, el pH ácido y reduce el umbral de temperatura requerido para la activación del TRPV1 (Vlachova y col., 2003; Liu y col., 2004; Valente y col., 2008).

Los estudios cristalográficos han revelado que el extremo amino terminal del TRPV1 consta de 6 repeticiones de ankirina, que están implicadas en la estructuración del tetrámero (Lishko y col., 2007; Liao y col., 2013). Asimismo, se han descrito varios sitios de fosforilación para diferentes quinasas, como PKC, PKA y CaMKII, en ambos extremos terminales y en los bucles intracelulares, que regulan la actividad del canal (Figura 12) (Bhave y col., 2002; Numazaki y col., 2002; Jung y col., 2004; Mandadi y col., 2006).

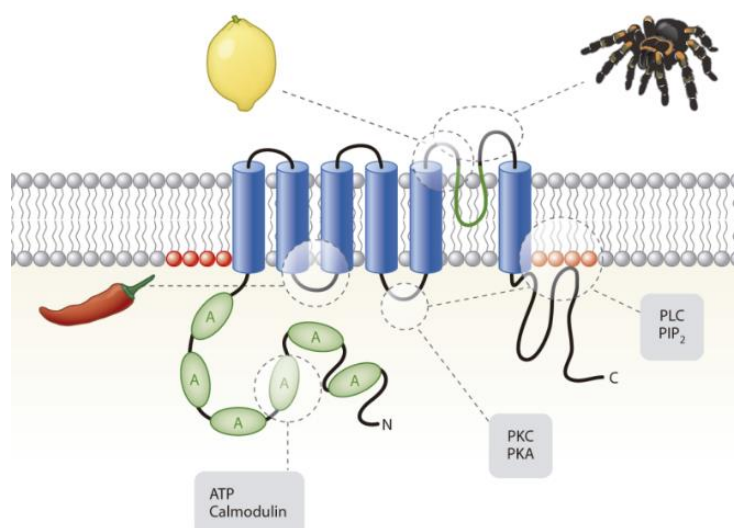


Figura 12. Representación esquemática del TRPV1. Se destacan varios dominios que confieren sensibilidad a los estímulos, incluyendo los sitios de acción de la capsaicina (chile) y ligandos tipo vanilloide, protones extracelulares (limón) o toxinas (tarántula). También se señalan los dominios que intervienen en la modulación fisiológica del canal. Adaptado de Julius (2013).

El calcio juega un papel crítico en la desensibilización o inactivación del TRPV1; el mecanismo aún genera controversia, por lo que se han propuesto varias opciones. En la primera de ellas la apertura del canal provoca el aumento de los niveles de calcio intracelular, activándose la CaM que, a su vez, actuaría sobre la calcineurina, una fosfatasa que defosforilaría al TRPV1, reduciendo su actividad (Docherty y col., 1996; Koplas y col., 1997; Mohapatra y Nau, 2005).

Otra posibilidad implica la unión de la Ca^{2+} -CaM al receptor, reduciendo su actividad. Esta proteína se une a varios sitios citosólicos del TRPV1, tanto a una secuencia que solapa

con el primer dominio de ankirina del N-terminal, donde compite con el ATP para unirse (Rosenbaum y col., 2004), como a una secuencia de la región carboxilo terminal. El ATP potencia la actividad del TRPV1 y previene la desensibilización del receptor (Kwak y col., 2000; Liu y col., 2005). Por ello, se ha sugerido que la CaM activada por el calcio que entra por el TRPV1 se une al dominio de ankirina en el N-terminal, desplazando al ATP, lo que conlleva la inactivación y la desensibilización del canal. Apoyando esta idea, la mutación de los sitios de unión del ATP en el TRPV1 abole la unión de la CaM al canal e impide la desensibilización de éste (Lishko y col., 2007; Lau y col., 2012).

Por otra parte, la delección del sitio de unión de la CaM en la región C-terminal también suprime la unión de esta proteína y reduce la desensibilización del TRPV1 (Numazaki y col., 2003). Por tanto, aunque la CaM muestra más afinidad por la región carboxilo terminal del receptor, ambos extremos citosólicos parecen jugar un papel importante en la desensibilización del TRPV1 (Lau y col., 2012; Hasan y Zhang, 2018).

Los estudios con ratones KO del TRPV1 y el empleo de agonistas y antagonistas han revelado las funciones fisiológicas de este canal. Existen múltiples evidencias que involucran al TRPV1 en el mantenimiento de la temperatura normal del cuerpo, actuando como termosensor en las neuronas sensoriales responsables de la transducción de la nocicepción física, química y térmica. Así, la exposición a dosis altas de capsaicina deteriora la capacidad de los animales a regular su temperatura corporal en ambientes calurosos, y la administración de antagonistas del TRPV1 produce una respuesta hipertérmica (Jancso-Gabor y col., 1970; Gavva y col., 2007).

Las temperaturas superiores a 42 °C u otros agonistas activan al TRPV1, provocando una sensación dolorosa. En consecuencia, el bloqueo del TRPV1 reduce la sensibilidad al calor a temperaturas normalmente nocivas (Szolcsanyi, 1977; Eid, 2011; Rowbotham y col., 2011). Sin embargo, los animales deficientes del TRPV1 muestran una sensibilidad normal a temperaturas elevadas, sugiriendo que otras moléculas participarían en la detección de temperaturas nocivas (Caterina y col., 2000; Davis y col., 2000; Woodbury y col., 2004).

Adicionalmente, este canal juega un papel esencial como termosensor en inflamación, cuando temperaturas menores de 42 °C producen dolor, un fenómeno denominado hiperalgia térmica. De hecho, la expresión del *TRPV1* se incrementa en respuesta a una situación de inflamación y de dolor crónico, al mismo tiempo que la actividad de este

receptor se potencia por los mediadores proalgésicos liberados durante la inflamación y el daño tisular (Huang y col., 2006; Camprubí-Robles y col., 2009). Estas moléculas proinflamatorias provocan la reducción de la temperatura umbral necesaria para la activación del TRPV1. En este mismo sentido, los ratones KO del TRPV1 o animales control administrados con antagonistas no manifiestan una hipersensibilidad térmica tras un proceso inflamatorio (Caterina y col., 2000; Davis y col., 2000; Bolcskei y col., 2005; Immke y Gavva, 2006).

El bloqueo del TRPV1 revierte la hiperalgesia asociada con el dolor neuropático e inflamatorio en roedores (Walker y col., 2003; Honore y col., 2005; Lehto y col., 2008; Kitagawa y col., 2013a). La implicación del TRPV1 en la nocicepción se debe a su presencia tanto en el SNC como a nivel periférico, dado que la administración de antagonistas por diferentes rutas revierte la hiperalgesia inflamatoria (Cui y col., 2006). La activación de las fibras C donde se expresa el TRPV1 contribuye al dolor agudo y crónico asociado con un amplio rango de condiciones fisiopatológicas que cursan con inflamación neurogénica como artritis, síndrome de intestino irritable, pancreatitis, migrañas y dolor oncológico (Szolcsanyi y Sandor, 2012).

Por otra parte, los antagonistas TRPV1 son eficaces en la supresión de la tos y la hipersensibilidad de las vías aéreas causadas por la capsaicina, el ácido cítrico y la ovoalbúmina (Laloo y col., 1995; Bhattacharya y col., 2007; Delescluse y col., 2012). Asimismo, el bloqueo de la actividad del TRPV1 es útil para reducir la hipersensibilidad del colon y la vejiga hiperreactiva (Charrua y col., 2009; Wiskur y col., 2010; Kiyatkin y col., 2013; Kitagawa y col., 2013b).

3.3.2. TRPA1

La subfamilia TRPA sólo consta de un miembro, el TRPA1, cuyo nombre procede del gran número de repeticiones de ankirina que presenta en su secuencia. El canal TRPA1 no presenta selectividad al Ca^{2+} , permitiendo el paso de otros cationes como Na^+ y K^+ . Aunque inicialmente se describió como un sensor de frío, activándose a temperaturas inferiores a $17\text{ }^{\circ}\text{C}$, este receptor se ha estudiado principalmente por su actividad quimio-nociceptora, detectando también estímulos mecánicos y osmóticos (Story y col., 2003; Laursen y col., 2015).

El TRPA1 se activa por una amplia variedad de compuestos endógenos y exógenos. Entre los agonistas más conocidos se encuentran moléculas electrofílicas irritantes como el isotiocianato (presente en la mostaza y el wasabi), la alicina (presente en el ajo) y el gingerol (presente en el jengibre). Asimismo, el TRPA1 se activa por compuestos no electrolíticos como el mentol y los cannabinoides (Jordt y col., 2004; Karashima y col., 2007), y ligandos endógenos como la bradiquinina, especies reactivas de oxígeno y el ácido nitro-oleico (Bandell y col., 2004; Takahashi y col., 2011).

Este receptor se localiza en las neuronas sensoriales de los ganglios del trigémino, geniculado, nodoso, superior cervical y de las raíces dorsales, en concreto en las neuronas A δ , fibras C y en algunas fibras A β . De hecho, el TRPA1 se encuentra principalmente en los nociceptores de pequeño diámetro que también expresan *TRPV1* (Hjerling-Leffler y col., 2007; Kim y col., 2010; Andrade y col., 2012). Fuera del sistema nervioso, el TRPA1 se localiza en células epiteliales, mastocitos, fibroblastos, odontoblastos, células enterocromafines y células β de los islotes de Langerhans (Prasad y col., 2008; Baraldi y col., 2010; Andrade y col., 2012; Bellono y col., 2013). Además, el patrón de expresión del *TRPA1* se modifica significativamente en condiciones patológicas, incluyendo enfermedades neuropáticas e inflamatorias (Obata y col., 2005; Katsura y col., 2006; Dai y col., 2007; Diogenes y col., 2007; Hjerling-Leffler y col., 2007).

Diferentes estudios han revelado una relación cruzada entre los canales TRPV1 y TRPA1. Se ha sugerido que la apertura del canal TRPV1, con el consiguiente incremento de los niveles de calcio intracelular, provoca la activación del TRPA1 (Bautista y col., 2006). De este modo, la respuesta a temperaturas elevadas no está mediada únicamente por el TRPV1, sino que el TRPA1 contribuye al control del umbral de temperatura en estas condiciones. A causa de su sensibilidad al calcio, el TRPA1 actuaría como un amplificador del TRPV1 tanto en condiciones normales como patológicas (Hoffmann y col., 2013). Por otra parte, también se ha descrito la sensibilización del TRPV1 por el TRPA1 a través de calcio y la actividad de la PKA (Anand y col., 2008; Spahn y col., 2013). Además, la activación de cualquiera de estos dos receptores induce un aumento de la inserción en la membrana plasmática del TRPA1, pero no del TRPV1, e incluso, se ha descrito la formación de heterotetrámeros constituidos por subunidades de ambos tipos (Akopian y col., 2007; Schmidt y col., 2009; Salas y col., 2009; Staruschenko y col., 2010).

El TRPA1 está muy conservado desde insectos hasta mamíferos, caracterizándose por presentar de 14 a 17 repeticiones de ankirina en su dominio amino terminal (Figura 13).

Los estudios mutagénicos han establecido que los ligandos electrofílicos interaccionan con un grupo de cisteínas y lisinas del extremo amino terminal del TRPA1 (Hinman y col., 2006; Macpherson y col., 2007). Además, ambos extremos citosólicos contienen sitios de unión de calcio, implicado tanto en la sensibilización como desensibilización del receptor (Jordt y col., 2004; Doerner y col., 2007).

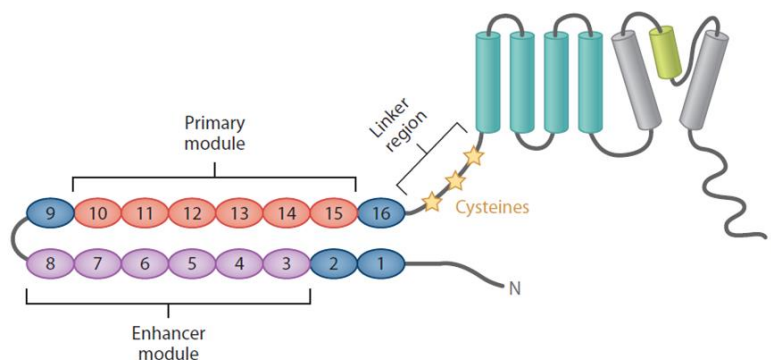


Figura 13. Representación del TRPA1. Los estudios de estructura-actividad destacan que el extremo N-terminal es esencial para modular la actividad del canal. Los agonistas electrolíticos se unen a las cisteínas señaladas entre la región transmembrana y los dominios de ankirina, mostrados como óvalos. Los dos módulos de ankirina en diferentes colores indican el sitio de actuación de otros factores (calcio citoplasmático o calor). Adaptado de Julius (2013).

El umbral de respuesta del TRPA1 depende del contexto celular, incluyendo sus niveles de expresión y los de otros canales iónicos, su estado de fosforilación e hidroxilación, y los niveles citoplasmáticos de calcio. Se ha propuesto que el calcio ejerce un efecto bimodal sobre el TRPA1: a bajas concentraciones (menores de 1 mM) potenciaría la actividad del canal, mientras que a niveles elevados (mayores de 1 mM) la inhibiría (Wang y col., 2008). Sin embargo, el mecanismo exacto no se conoce. Los primeros resultados sugirieron que el calcio, sin intervención de la CaM, se unía directamente a los dominios intracelulares del canal (Zurborg y col., 2007; Doerner y col., 2007; Sura y col., 2012). No obstante, estudios posteriores han revelado que la CaM sí sería responsable de los efectos opuestos del calcio. De hecho, esta proteína se une a una región carboxilo terminal del receptor, y mutaciones en dicha región abolen tanto la potenciación como la inhibición del TRPA1 mediada por calcio (Cordero-Morales y col., 2011; Hasan y col., 2017).

Se han descrito numerosas sustancias activadoras de este canal, lo que ha permitido estudiar ampliamente al TRPA1 como quimiosensor (Zygmunt y Högestätt, 2014). Es bien

conocido que la aplicación cutánea de los agonistas electrofílicos del TRPA1 producen quemazón, hipersensibilidad mecánica y térmica e inflamación neurogénica (Koltzenburg y col., 1992; Olausson, 1998; Namer y col., 2005). En consonancia, los ratones deficientes del TRPA1 apenas manifiestan síntomas tras la administración de estas sustancias (Macpherson y col., 2007; McNamara y col., 2007). Ciertas moléculas como carragenanos, formalina e isotiocianato se emplean frecuentemente para inducir inflamación, hiperalgesia y alodinia en modelos animales. Estos irritantes estimulan la producción de mediadores inflamatorios que actúan directa o indirectamente sobre el TRPA1 (Mogil, 2009; Andrade y col., 2012; Moilanen y col., 2012). Este receptor también puede ser activado por productos endógenos del estrés oxidativo o nitrosativo, como derivados de prostaglandinas, que están comúnmente asociados a síndromes crónicos inflamatorios. Así, se ha revelado la participación del TRPA1 en la nocicepción, hiperreactividad sensorial y progresión de enfermedades inflamatorias como artritis, asma, dermatitis, síndrome del intestino irritable y pancreatitis (Bessac y Jordt, 2008; Holzer, 2011; Bautista y col., 2013; Kaneko y Szallasi, 2013).

Además, el TRPA1 también detecta estímulos mecánicos nocivos (Kerstein y col., 2009; Kwan y col., 2009; da Costa y col., 2010; Fernandes y col., 2011). Por ello, los animales KO del TRPA1 apenas sienten los estímulos punzantes, y sus aferencias pélvicas, vagales y esplácnicas apenas responden a la distensión nociva del colon (Kwan y col., 2006; Brierley y col., 2009).

Por otra parte, se ha descrito la sobreexpresión frecuente del *TRPA1* en neuronas cercanas al sitio donde se ha producido el daño, asociándose con el desarrollo de la neuropatía periférica (Obata y col., 2005; Katsura y col., 2006). Por ejemplo, el microentorno químico del cáncer favorece la expresión, sensibilización y activación del TRPA1, mientras que las quimioterapias oncológicas neurotóxicas causan alodinia mecánica y térmica mediadas por el TRPA1, junto con el TRPM8 y el TRPV1 (Ye y col., 2011; Lozano-Ondoua y col., 2013).

El descubrimiento de un síndrome de dolor episódico familiar autosómico dominante causado por una mutación de ganancia de función en el TRPA1 ha resaltado su papel fundamental en la nocicepción. Esta mutación altera la respuesta a voltaje del TRPA1 y produce una respuesta exacerbada del canal a los ligandos electrófilos y al frío. En consecuencia, los pacientes manifiestan hiperalgesia y episodios de dolor tras situaciones de estrés físico (Kremeyer y col., 2010).

Aunque la inhibición del TRPA1 parecería la estrategia de tratamiento más lógica para conseguir un alivio de los síntomas inflamatorios y neuropáticos, la inyección espinal, sistémica o intraplantar de agonistas del TRPA1 reduce la señalización nociceptiva (Andersson y col., 2011; Weng y col., 2012; Materazzi y col., 2013; Kojima y col., 2014). Por tanto, dependiendo del lugar de acción y las propiedades químicas del compuesto, tanto agonistas como antagonistas del TRPA1 serían útiles para el tratamiento del dolor, al igual que ocurre con el TRPV1 (Patapoutian y col., 2009; Mallet y col., 2010; Andersson y col., 2011; Barrière y col., 2013; Kaneko y Szallasi, 2013). Aunque el *TRPA1* se coexpresa con el *TRPV1* en las aferencias primarias, las intervenciones farmacológicas sobre uno u otro receptor producen efectos adversos muy diversos. Desafortunadamente, actualmente no se disponen de fármacos que modulen la actividad del TRPA1 para el uso en clínica, debido a la complejidad de trasladar los estudios con modelos animales a humanos.

3.3.3. TRPM8

El TRPM8 es el último miembro identificado de la familia de los TRPM, clonado inicialmente de tejido prostático canceroso, al ser un receptor cuya sobreexpresión es dependiente de andrógenos. Se le ha relacionado con el inicio y la progresión de diversos tumores, entre ellos adenocarcinomas, melanomas, cáncer colorrectal, de próstata, de pulmón y de mama (Tsalaver y col., 2001; Yu y col., 2014; Kijpornyongpan y col., 2014; Liu y col., 2016). Más recientemente, se ha descrito la presencia del TRPM8 en una subpoblación de neuronas sensoriales primarias de los ganglios del trigémino y de las raíces dorsales, concretamente en las fibras C no mielinizadas y de pequeño diámetro, así como en una pequeña cohorte de fibras A δ (McKemy y col., 2002; Peier y col., 2002). De hecho, en cierto número de fibras C se ha observado la coexpresión de *TRPV1* y *TRPM8*, al igual que en melanocitos, fibroblastos, mastocitos y células enterocromafines (Julius, 2013; Zygmunt y Högestätt, 2014).

Además de las regiones estructurales típicas de la familia TRP, la subfamilia TRPM se caracteriza por presentar un dominio tipo *coil-coiled* en el extremo carboxilo terminal, y una región homóloga TRPM en el extremo amino que está implicada en la configuración del canal y su tráfico (Figura 14). Contrariamente a otras familias TRP, la secuencia de estos receptores no incluye repeticiones de ankirina, pero el largo extremo carboxilo es altamente variable y consta de dominios enzimáticos activos en algunos de los miembros

de TRPM (Kraft y Harteneck, 2005; Fujiwara y Minor, 2008). Diversos estudios realizados con canales quiméricos del TRPM8 y el TRPV1 sugieren que la región C-terminal contiene elementos estructurales implicados en la apertura inducida del canal por la temperatura (Brauchi y col., 2006).

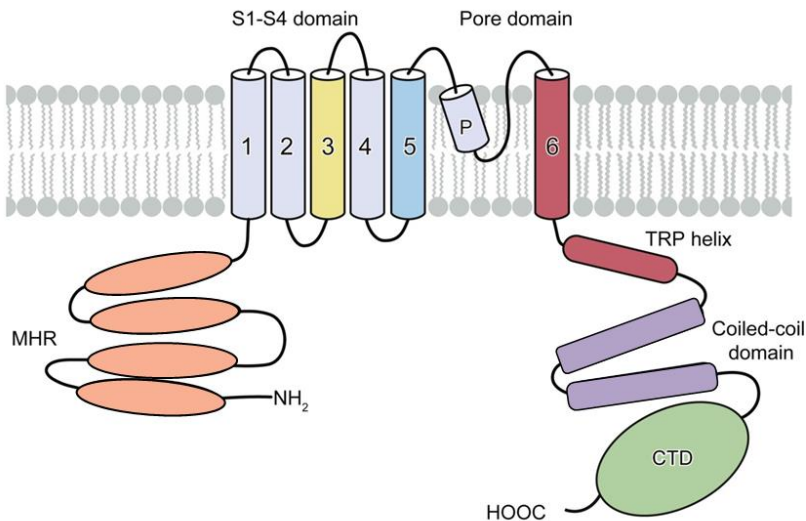


Figura 14. Representación del TRPM8. Se indican el extremo amino, las regiones transmembrana S1-S6 y el extremo carboxilo. En el extremo amino destaca la región homóloga TRPM (MHR). En el extremo C-terminal se localiza la hélice TRP y el dominio tipo *coil-coiled* característico de los TRPMs. El dominio carboxilo terminal (CTD) varía entre los diferentes miembros de la subfamilia TRPM. Adaptado de Huang y col., (2020).

A nivel neuronal, este receptor funciona como un sensor térmico, activándose a temperaturas menores de 26 °C y provocando que la temperatura corporal aumente (Clapham y col., 2005; Su y col., 2011). Otros agonistas muy estudiados son el mentol y sus derivados, el eucaliptol y la molécula sintética icilina (Behrendt y col., 2004; Beck y col., 2007; Boddington y col., 2007). Todos ellos, al ser inhalados o aplicados sobre la piel o las mucosas, ocasionan una sensación de frío. Por tanto, el TRPM8 al igual que otros canales TRP, es un receptor polimodal, activándose por estímulos físicos (baja temperatura), químicos (mentol) o voltaje (Voets y col., 2007). Estos agonistas sensibilizan al receptor, facilitando su apertura a temperaturas más elevadas y, por tanto, mimetizando una sensación psicofísica de frío. La activación del canal conlleva la apertura del poro, que no es selectivo y permite el paso tanto de iones calcio como de sodio (McKemy y col., 2002; Peier y col., 2002).

El TRPM8 se ha detectado en las fibras aferentes del colon donde también se expresa el TRPV1. La activación de estas neuronas por el agonista del TRPM8 icilina, desensibiliza la respuesta a capsaicina, sugiriendo un posible efecto antinociceptivo del TRPM8 en el intestino (Harrington y col., 2011). De hecho, se ha demostrado que la activación del TRPM8 provocada por el frío moderado o algunos agonistas desensibiliza las neuronas sensoriales, impidiendo la transmisión de otros estímulos (McKenny y col., 2002; Zholos y col., 2011; Liu y col., 2016).

La expresión del TRPM8 en neuronas termosensoriales ha llevado a estudiar su papel en la termocepción y el dolor. Así, la hipersensibilidad al frío característica de diferentes modelos animales de dolor, tanto inflamatorio como neuropático, se atenúa con bloqueantes de este canal o en animales deficientes del TRPM8 (Colburn y col., 2007; Xing y col., 2007; Knowlton y col., 2011). Por tanto, los animales carentes del TRPM8 no son capaces de discriminar entre temperaturas templadas (15 – 30 °C) o frías (menores de 15 °C). La inflamación tisular o el daño nervioso asociado a trauma, diabetes, infecciones virales o quimioterapia puede provocar una hipersensibilidad extrema al frío. En este sentido, se ha detectado la hiperactivación de este receptor en las neuropatías periféricas con hipersensibilidad al frío provocadas por el tratamiento antitumoral con oxaliplatino (Gauchan y col., 2009; Knowlton y col., 2011; Kawashiri y col., 2012). Asimismo, las fibras dérmicas inmunoreactivas para el TRPM8 son sustancialmente menos numerosas en pacientes con insensibilidad congénita al frío tipo Norrbotten (Axelsson y col., 2009). Por tanto, el uso de moduladores del TRPM8 podría ser útil para el manejo del dolor inducido por frío. Por el contrario, es bien conocido que el frío tiene efectos analgésicos en situaciones de dolor y, de hecho, los agonistas del TRPM8 alivian la sensación dolorosa en algunos modelos animales de neuropatía (Proudfoot y col., 2006).

3.4. Regulación cruzada entre GPCRs y canales iónicos

En el sistema nervioso, los receptores de NMDA se coordinan con los GPCRs para regular la eficacia de la función sináptica. Así, algunos GPCRs reclutan la actividad del NMDAR, incluyendo el MOR (Martin y col., 1997), el receptor de dopamina D1 (Greengard, 2001), metabotrópicos de glutamato del grupo I (mGluR1/5), del grupo II (mGluR2/3) (Guo y col., 2004; Tyszkiewicz y col., 2004) y de serotonina 2A/C (Yuen y col., 2008). Por el contrario, otros GPCRs como el receptor CB1 (Marsicano y col., 2003;

Liu y col., 2009), muscarínico de acetilcolina tipo 1 (Grishin y col., 2005), de serotonina 1A (Yuen y col., 2005; Vicente-Sánchez y col., 2013), adrenérgicos $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (Liu y col., 2006) y mGluR7 del grupo III (Gu y col., 2012) reducen la actividad del NMDAR, previniendo el riesgo de excitotoxicidad. Diferentes estudios han descrito la asociación física del extremo carboxilo terminal de varios GPCRs, entre ellos el MOR (Rodríguez-Muñoz y col., 2012), CB1R (Sánchez-Blázquez y col., 2013) y dopaminérgico D1 (Fiorentini y col., 2003) con la región C1 citosólica de las subunidades NR1 del NMDAR.

La modulación farmacológica de la señalización del MOR por la cascada NMDAR/NO está sólidamente documentada (Trujillo, 2002; Garzón y col., 2008). Actualmente se sabe que la interacción entre estos receptores es bidireccional, ya que la activación del MOR aumenta la actividad del NMDAR que, a su vez, va a reducir el tono funcional del MOR, frenando la capacidad de los opioides de producir analgesia y, por tanto, contribuyendo al desarrollo de tolerancia (Chen y col., 1991; Heinricher y col., 2001; Sánchez-Blázquez y col., 2008). Por otra parte, a través del MOR los opioides regulan la actividad del NMDAR en diferentes áreas del sistema nervioso, incluyendo el tálamo (Narita y col., 2008), el núcleo cerúleo (Koyama y Akaike, 2008), el bulbo raquídeo (Chen y Huang, 1991; Kow y col., 2002) y las neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Rusin y Randic, 1991).

El tándem integrado por la HINT1 y el $\sigma 1R$ es esencial para conectar los GPCRs, como el MOR, con el NMDAR (Rodríguez-Muñoz y col., 2015b). El $\sigma 1R$, considerado inicialmente un tipo de receptor opioide, es una proteína lineal que se expresa ampliamente en el sistema nervioso, localizándose a nivel celular en la membrana citoplasmática y el retículo endoplásmico (Martin y col., 1976; Kitaichi y col., 2000). Mediante estudios en sistemas celulares, ensayos *in vitro* e *in vivo*, se ha demostrado que la asociación del $\sigma 1R$ con diferentes proteínas señalizadoras depende de calcio, y que se modifica por una serie de sustancias exógenas y endógenas, como los neuroesteroides (Hayashi y Su, 2007; Hayashi y col., 2011; Rodríguez-Muñoz y col., 2015b).

La farmacología de este receptor $\sigma 1R$ es compleja, debido a que los ligandos manifiestan un perfil distinto en función del sistema estudiado (Maurice y Su, 2009). Sin embargo, debido a la capacidad del $\sigma 1R$ de modular la transmisión del NMDAR, el estudio de estas sustancias es muy interesante para su aplicación en el tratamiento de enfermedades neurológicas, síndromes de abuso de sustancias, disfunciones neuronales relacionadas con el NMDAR como ciertos desórdenes neuropsiquiátricos, la alodinia y la hiperalgesia asociadas a la neuropatía, además de su uso como adyuvantes de la analgesia opioide (Díaz

y col., 2009; Kim y col., 2010; Hayashi y col., 2011; Kourrich y col., 2012; Robson y col., 2012; Romero y col., 2012, Vidal-Torres y col., 2013).

La asociación GPCR-NMDAR obedece a un proceso dinámico regulado principalmente por la coordinación de la proteína HINT1 con el σ 1R. En esta función, la HINT1 se une a las secuencias citosólicas de los GPCRs y de la subunidad NR1 de forma independiente de calcio. Por el contrario, la asociación del σ 1R con estas proteínas aumenta significativamente en presencia de niveles fisiológicos de este catión. La relación entre ambas proteínas es asimétrica, de modo que el σ 1R previene que la HINT1 se una a la NR1 al tiempo que debilita la asociación de la HINT1 con los GPCRs; sin embargo, la HINT1 no afecta a las interacciones del σ 1R con la NR1 ni con los GPCRs (Sánchez-Blázquez y col., 2014; Rodríguez-Muñoz y col., 2015b). Los agonistas del σ 1R como la pregnenolona sulfato, junto con niveles elevados de calcio, potencian la asociación del σ 1R con la subunidad NR1, mientras que reducen la unión del σ 1R a los GPCR, lo que conlleva el refuerzo de la asociación HINT1-GPCR. Por tanto, los agonistas del σ 1R frenan el control de los complejos GPCR-HINT1 sobre las subunidades NR1. Por el contrario, los antagonistas apenas reducen la unión del σ 1R a los GPCRs, pero sí retiran al σ 1R de los NMDARs activados, promoviendo así la transferencia de la HINT1 desde los GPCRs activados y fosforilados a las subunidades NR1 C1 (Sánchez-Blázquez y col., 2014; Rodríguez-Muñoz y col., 2015b). Como resultado, los NMDARs se desacoplan de la influencia positiva, o negativa, de los GPCRs.

En consonancia, en los animales carentes de la HINT1 o del σ 1R, la morfina no recluta la función del NMDAR, y la activación directa del receptor de glutamato no reduce la analgesia de morfina (Rodríguez-Muñoz y col., 2011; Rodríguez-Muñoz y col., 2015a). Asimismo, la recuperación de la expresión de la HINT1 o del σ 1R en estos modelos animales reestablece la regulación cruzada entre el MOR y el NMDAR (Vicente-Sánchez y col., 2013; Rodríguez-Muñoz y col., 2015a).

Seguidamente a la formación del complejo GPCR-HINT1- σ 1R-NMDAR, la activación de los receptores tipo MOR incrementa la actividad del NMDAR acoplado vía PKC/Src. La PKC promueve la separación de MOR-HINT1 de la subunidad NR1 C1 fosforilada que se lleva consigo al σ 1R. Por otro lado, la Src fosforila residuos de tirosina de las subunidades NR2 incrementando la permeabilidad al calcio, lo que favorece la unión del σ 1R al NMDAR. Por tanto, los receptores de NMDA activados y fosforilados manifiestan una baja afinidad por la HINT1 y esto imposibilita su acoplamiento al MOR.

Así, este ciclo comenzaría cuando un σ 1R junto con un NMDAR silente (no fosforilado) se unieran al complejo MOR-HINT1, y terminaría con la liberación del receptor de glutamato activo y fosforilado (Figura 15) (Rodríguez-Muñoz y col., 2015a).

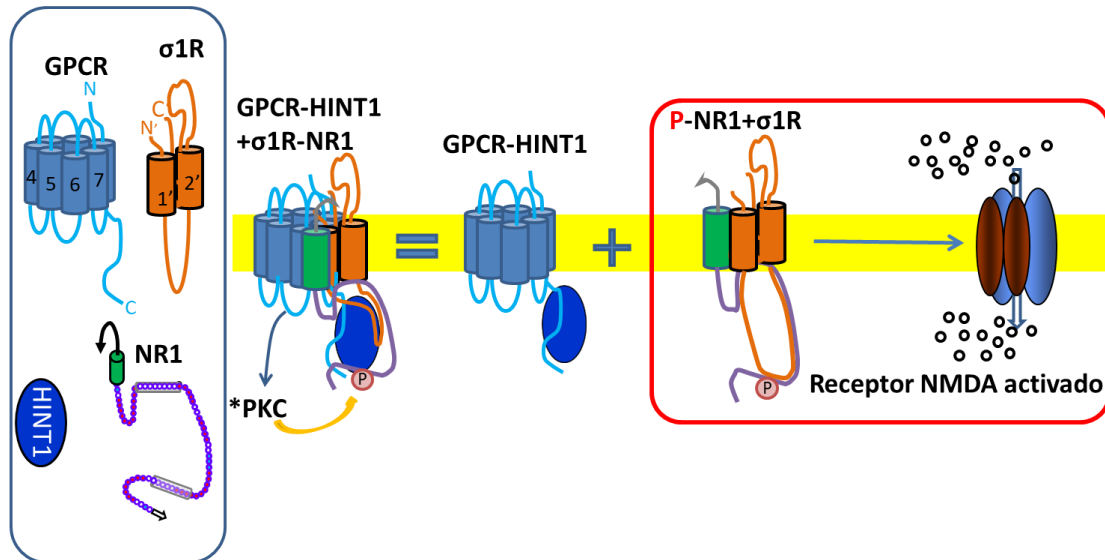


Figura 15. Proceso dinámico de la asociación entre un GPCR activador y el NMDAR. Tras la formación del complejo GPCR-HINT1- σ 1R-NMDAR, la activación del GPCR induce la activación de la PKC. Esta quinasa fosforila el extremo citosólico de la subunidad NR1 del NMDAR, incrementando la actividad del canal. Por tanto, aumentan los niveles de calcio y el σ 1R se une con más afinidad al NMDAR. Así, el NMDAR activado por el GPCR se separa, llevándose al σ 1R y dejando a la HINT1 unida al GPCR; mientras el complejo GPCR-HINT1 se mantenga, el receptor puede repetir este proceso de activación de receptores de NMDA.

Además de al receptor de NMDA, los GPCRs pueden modular directa o indirectamente a los canales TRPs. Los neuropéptidos proalgésicos activan a los GPCRs que, a su vez, median la activación directa o sensibilización de los TRPs mediante diferentes quinzas o la PLC. En este contexto, agonistas de GPCRs, entre ellos receptores de serotonina tipo 2 y 4 y mGluR1/5 potencian la entrada de calcio por el canal TRPV1 (Szallasi y col., 2007; Kim y col., 2009; Yekkirala, 2013). Asimismo, se ha descrito la implicación del TRPV1 en el desarrollo de tolerancia a morfina. La administración crónica de morfina, a través de la ruta de las MAPKs, potencia la expresión del TRPV1 en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG, del inglés *dorsal root ganglia*), la médula espinal y el nervio ciático, desarrollándose tolerancia, dependencia e hiperalgesia térmica. En consecuencia, los inhibidores de las MAPKs bloquean la sobreexpresión del TRPV1, mientras que los antagonistas del TRPV1 atenúan los efectos adversos inducidos por el tratamiento crónico de morfina (Chen y col., 2008; Vardanyan y col., 2009; Nguyen y col., 2010).

Investigaciones más recientes han desvelado la coprecipitación del MOR y el TRPV1 cuando se expresan exógenamente en cultivos celulares. La unión del TRPV1 bloquea la fosforilación inducida por opioides del MOR por β -arrestina, responsable del mecanismo canónico de desensibilización de los GPCR (Scherer y col., 2017). Igualmente, se ha descrito la asociación del TRPM8 con el MOR1. La activación prolongada del receptor opioide por morfina conduce a una reducción en la actividad del TRPM8, debido a la progresiva internalización conjunta de ambos receptores (Shapovalov y col., 2013).

Por otra parte, tanto el déficit del σ 1R como sus antagonistas progesterona y BD1063, reducen la expresión del TRPV1 en la membrana plasmática de las neuronas sensoriales. Se ha sugerido que el σ 1R es necesario para el correcto plegamiento del TRPV1 en el retículo endoplásmico y su tráfico hasta la membrana plasmática, evitando su degradación por el proteasoma (Ortíz-Rentería y col., 2018).

Objetivos

La proteína HINT1 está altamente conservada en la filogenia y pertenece a la familia HIT, caracterizada por poseer una tríada de histidinas que en varios de sus miembros está implicada en una actividad hidrolasa. Sin embargo, en el caso particular de la HINT1, se desconocen sus sustratos fisiológicos y, por consiguiente, la posible relevancia biológica de esta actividad. A nivel clínico, la HINT1 se ha asociado con diversas patologías, destacando los trastornos motores y neuropsiquiátricos. En concreto, en humanos se han descrito 15 mutaciones puntuales recesivas de la HINT1 responsables de causar ARAN-NM (Zimon y col., 2012). Por otra parte, la HINT1 está implicada en esquizofrenia, trastorno bipolar, ansiedad, dolor y analgesia, y adicción a drogas (Straub y col., 1997; Vawter y col., 2004; Garzón y col., 2012; Sánchez-Blázquez y col., 2014; Garzón y col., 2015; Rodríguez-Muñoz y col., 2017)

A partir del conocimiento aportado por numerosos grupos de investigación, incluido el nuestro, en este trabajo de Tesis me he planteado estudiar la función de la HINT1 como proteína de ensamblaje y/o chaperona tanto en la membrana plasmática como en el núcleo. Se ha descrito que, en la membrana celular, la HINT1 interacciona con una amplia variedad de proteínas de señalización como diferentes GPCRs, PKC, RGS y NMDAR (Guang y col., 2004; Ajit y col., 2007; Rodríguez-Muñoz y col., 2011a). En el núcleo, la HINT1 juega un papel importante como proteína represora de la transcripción génica asociándose con diferentes factores de transcripción como el complejo Pontin/Reptin y el ICD de la teneurina 1 (Su y col., 2003; Li y col., 2006; Scholer y col., 2015). Además, la HINT1 participa en la respuesta al daño del ADN, promueve apoptosis, muestra actividad supresora tumoral e inhibe la proliferación de células en diferentes tipos de cáncer (Su y col., 2003; Weiske y Huber, 2006; Li y col., 2008; Zhang y col., 2009). La HINT1 interacciona en ambas localizaciones celulares con proteínas sumoiladas, y cumple con los requisitos para actuar como SUMO proteasa, ya que posee un dominio de interacción de SUMO y dos cisteínas en un dominio típico para esta actividad.

En esta Tesis Doctoral, se evalúa en modelos animales la participación de la proteína HINT1 en la génesis o expresión de diversos trastornos psiquiátricos, particularmente la manía y el síndrome bipolar. De este modo, mediante una serie de test comportamentales dirigidos al estudio de conductas tipo “maniacas” y/o “depresivas”, se analiza el comportamiento de los ratones KO de la HINT1 y su respuesta a diversas intervenciones farmacológicas. Por otro lado, se estudia la actividad SUMO proteasa de la HINT1 y su regulación por moléculas fisiológicas y por proteínas ya conocidas que interaccionan con

la HINT1. Se incluyen los mutantes de la HINT1 que en humanos causan el trastorno motor ARAN-NM, analizando su actividad isopeptidasa así como su capacidad para asociarse con otras proteínas de señalización. Finalmente, y como extensión del estudio realizado para determinar la conexión entre la HINT1 y el canal de calcio regulado por glutamato, el receptor tetramérico NMDA, se estudia su posible asociación con otros canales de calcio también tetraméricos como los TRPs. Sobre canales TRPs seleccionados se evalúa la relación de la HINT1 con el σ 1R y la CaM, así como el efecto de los ligandos del σ 1R en sus asociaciones con dichos TRPs. Asimismo, considero relevante analizar si la relación existente entre el receptor pro-nociceptivo NMDAR y el antinociceptivo MOR, se detecta también entre el MOR/NMDAR y el canal TRPA1, muy implicado en la quimionocicepción.

Los objetivos concretos del estudio se pueden resumir en los siguientes apartados:

1. Exploración conductual y molecular de los ratones HINT1^{-/-}. Se realizarán los ensayos de comportamiento habituales para caracterizar a los ratones BStac, modelo animal propuesto para el estudio de la “manía”, y que utilizaremos en paralelo como referencia al comportamiento de los ratones KO de la HINT1. A continuación, se estudiará el efecto de diferentes fármacos sobre la conducta alterada de los ratones HINT1^{-/-} y se explorará el potencial de los ligandos del σ 1R como moduladores del comportamiento de los ratones “maniacos”. Por otra parte, se analizará el papel del estrés como posible modificador de la conducta de estos animales “maniacos”. Posteriormente, se llevará a cabo un estudio *ex vivo* a partir de preparaciones de sinaptosomas de la corteza prefrontal de los ratones HINT1^{-/-} y BStac, y sus respectivos controles, para analizar si existen alteraciones moleculares en la enzima GSK3 β y el NMDAR que pudieran subyacer a las conductas “maniacas”. Además, se evaluará el efecto de la inhibición de la PKC en los niveles y fosforilaciones de la GSK3 β en los ratones carentes de la HINT1.

2. Estudio de la posible actividad SUMO proteasa de la HINT1. En ensayos *in vitro* con proteínas recombinantes se determinará la posible unión de la proteína HINT1 al SUMO y la CaM. Mediante mutaciones puntuales de la HINT1 se identificará su sitio SIM y la secuencia de unión a la CaM. De forma similar, se analizará la asociación de la HINT1 con varias proteínas susceptibles de ser sus sustratos sumoilados. A continuación, se evaluará la actividad isopeptidasa de la HINT1 empleando como control de actividad a las proteasas específicas de sentrina SENP1/SENP2. Se explorarán diferentes condiciones para optimizar la actividad sumoilasa de la HINT1 y sus posibles reguladores fisiológicos.

Además, se estudiará el efecto de un inhibidor y un sustrato previamente descritos para la actividad hidrolasa de la HINT1, así como el papel de los iones metálicos divalentes sobre la actividad SUMO proteasa de la HINT1. Se generarán los mutantes necesarios para identificar el centro catalítico de la HINT1, y se analizará la regulación de la actividad isopeptidasa de la HINT1 por proteínas de señalización como el MOR, la subunidad NR1 del NMDAR y el σ 1R. Una vez analizada la actividad de la HINT1 *in vitro*, se explorará el posible significado de esta regulación *in vivo*.

3. Caracterización molecular de los mutantes de la HINT1 causantes de la ARAN-NM. Se prepararán los mutantes humanos de la HINT1 hasta ahora descritos mediante su clonaje y expresión en *E. coli*, y posterior purificación. Se evaluará la actividad SUMO proteasa de los mutantes de la HINT1 causantes de la ARAN-NM, y la naturaleza de su interacción con diferentes proteínas de señalización mediante ensayos *in vitro* de tipo *pull-down*. De este modo, se llevará a cabo el estudio de las asociaciones de los mutantes humanos de la HINT1 con las proteínas implicadas en la sumoilación, CaM y SUMO1. Asimismo, se evaluará la asociación de estos mutantes con los receptores de membrana plasmática MOR y NMDAR, con los sustratos de sumoilación RGSZ2 e ICD de teneurina 1 y, finalmente, con el σ 1R.

4. Determinación de la posible unión de la HINT1, del σ 1R y de la CaM a las regiones citosólicas de los TRPs seleccionados. Mediante ensayos de interacción *in vitro* se analizará la asociación de las regiones citosólicas amino y carboxilo terminales del TRPV1, TRPA1 y TRPM8, con la HINT1, el σ 1R y la CaM. Se evaluará el efecto del calcio en estas uniones y si existe competición entre la unión de estas tres proteínas sobre estos TRPs. Finalmente, se estudiará el efecto de los ligandos del σ 1R en sus interacciones con TRPV1, A1 y M8.

5. Análisis de la posible interacción entre el canal TRPA1 con el MOR y el NMDAR en el SN de ratón. Se inmunoprecipitarán los receptores MOR y NMDA en preparaciones de sinaptosomas obtenidas a partir de diferentes regiones del sistema nervioso. Se estudiará la posible coprecipitación del TRPA1 con el MOR y la subunidad NR1 del NMDAR en situación basal, así como su plasticidad en respuesta a diferentes intervenciones farmacológicas y modelos de dolor. Se clonarán el MOR, el segmento C0-C1-C2 de la subunidad NR1 y los extremos amino y carboxilo terminales del TRPA1 para determinar *in vitro* si la asociación observada en el tejido nervioso solubilizado responde a una interacción física directa o mediada por una tercera proteína.

Parte del trabajo realizado ha dado lugar a las siguientes publicaciones en revistas especializadas e indexadas. Se anexan a esta Tesis Doctoral:

- Garzón-Niño, J, Rodríguez-Muñoz, M, Cortés-Montero, E, Sánchez-Blázquez, P. Increased PKC activity and altered GSK3 β /NMDAR function drive behavior cycling in HINT1-deficient mice: bipolarity or opposing forces. *Scientific Reports* 7: 43468-43487 (2017). I. F. 4,12
- Sánchez-Blázquez, P*, Cortés-Montero, E*, Rodríguez-Muñoz, M, Garzón, J. Sigma 1 receptor antagonists inhibit manic-like behaviors in two congenital strains of mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 21 (10): 938-948 (2018). I. F. 4,21 *Ambas autoras han contribuido igual al estudio.
- Cortés-Montero, E, Rodríguez-Muñoz, M, Sánchez-Blázquez, P, Garzón, J. The axonal motor neuropathy-related HINT1 protein is a zinc- and calmodulin-regulated cysteine SUMO protease. *Antioxid Redox Signal.* 31 (7): 503-520 (2019). I. F. 6, 32
- Cortés-Montero, E, Sánchez-Blázquez, P, Onetti, Y, Merlos, M, Garzón, J. Ligands exert Biased Activity to regulate Sigma 1 Receptor interactions with cationic TRPA1, TRPV1 and TRPM8 channels. *Front Pharmacol.* 10: 634- 646 (2019). I. F. 4,23
- Cortés-Montero, E, Rodríguez-Muñoz, M, Ruiz-Cantero, MC, Cobos, EJ, Sánchez-Blázquez, P, Garzón, J. Calmodulin supports TRPA1 channel association with opioid receptors and glutamate NMDA receptors in the nervous tissue. *Int J Mol Sci.* 22 (1): E229 (2020). I. F. 4,56
- Cortés-Montero, E, Rodríguez-Muñoz, M, Sánchez-Blázquez, P, Garzón-Niño, J. Human HINT1 mutant proteins that cause axonal motor neuropathy exhibit anomalous interactions with partner proteins. *Mol Neurobiol.* (2021). I. F. 4,5

Materiales y Métodos

1. Materiales

1.1. Animales de experimentación

En este estudio se utilizaron ratones macho no consanguíneos, con una edad de entre 6 y 10 semanas, de las siguientes cepas: variedad albina de la cepa CD1 Swiss (*ENVIGO, Milano, Italia*), KO para la proteína $\sigma 1R$ con fondo genético de CD1 Swiss albino (cedidos por Esteve), Black Swiss control (BScr; *Charles River, Estados Unidos*) y Black Swiss “maniacos” procedentes de la granja Taconic (BStac; *Taconic Farms, Estados Unidos*). También se emplearon ratones WT y KO para la proteína HINT1 con un 96 % de fondo genético procedente de la cepa 129/SvJ (cedidos por el Dr. Weinstein I.B. y la Dra. Wang J.B.). En los ratones deficientes de la HINT1 se había sustituido el primer exón del gen que codifica para la HINT1 por un casete de resistencia a neomicina (PGKneo), según el procedimiento detallado por el grupo de Tao (Su y col., 2003). Todos los animales se mantuvieron en el animalario en condiciones de agua y comida *ad libitum*, periodos de luz y oscuridad de 12 horas y temperatura ambiente de 22 °C.

La estabulación y utilización de los animales siguió la normativa vigente de la Unión Europea (*EU 2010/63/EU*) y de España (*RD53/2013*) sobre uso y experimentación con animales de laboratorio. Todos los experimentos fueron aprobados por la Comisión de Ética para la experimentación animal del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (PROEX 225/14).

1.1.1. Genotipado de los ratones 129/SvJ

Los animales se genotiparon a partir de ADN genómico extraído de la cola del ratón. Las biopsias se incubaron 10 minutos a 95 °C con 80 μ L de tampón de lisis Gitschier modificado 1X (Tris-HCl 67 mM pH 8,8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 16,6 mM, MgCl_2 6,5 mM) con β -mercaptoetanol 1 % y Tritón X-100 0,5 %. Cuando las muestras se atemperaron, se añadieron 5 μ L/tubo de proteinasa K (*19131, QIAGEN*) para favorecer la lisis celular. Las muestras se incubaron en un baño a 56 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se inactivó la proteasa a 95 °C durante 5 minutos y el sobrenadante, previa dilución 1:5, se empleó como molde para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación por PCR se llevó a cabo con la AccuPrime™ Pfx ADN polimerasa (*12344024, Invitrogen*) con el siguiente protocolo: 2 minutos iniciales a 94 °C; 30 ciclos de 20 segundos a 94 °C, 20 segundos a 55 °C, 40 segundos a 72 °C; una incubación final

de 5 minutos a 72 °C. Finalmente, los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa (Figura 16). Para amplificar los fragmentos correspondientes al genotipo WT (339 pares de bases) y KO (285 pares de bases) se utilizaron las parejas de *primers* AB y BC, respectivamente:

- **Primer A** (específico del alelo silvestre)

5'- GCCCCCTGTAAAGTGCAGAC-3'

- **Primer B** (común para el alelo silvestre y el alelo recombinante)

5'- CGCCCCAGTTAGTTAGTCAG-3'

- **Primer C** (específico del alelo mutante)

5'- GCCTGAAGAACGAGATCAGC-3'

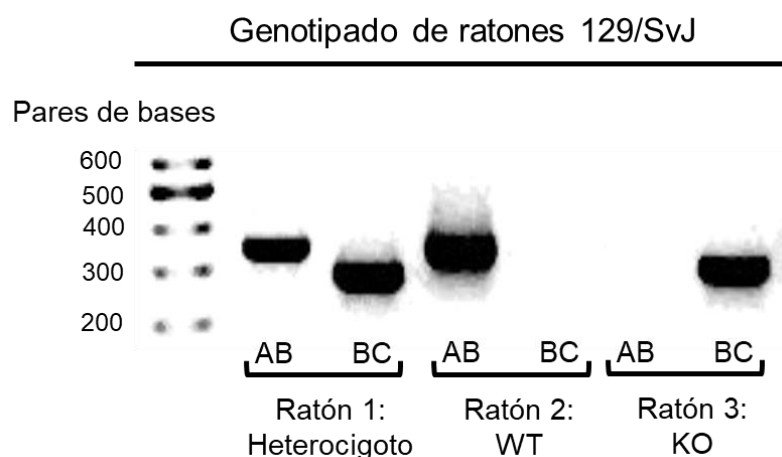


Figura 16. Genotipado de ratones 129/SvJ. Se muestra una electroforesis representativa del genotipado de los animales 129/SvJ para determinar su expresión de HINT1. Para cada muestra de ADN se emplearon dos parejas de *primers* AB y BC, que permitieron amplificar los fragmentos correspondientes al genotipo WT (339 pares de bases) y KO (285 pares de bases). WT: *wild-type*; KO: *knock-out*.

1.2. Anticuerpos

Para el desarrollo de este estudio se han empleado anticuerpos policlonales generados y purificados por *GeneScript Co.* o *Immunostep (España)* y caracterizados en el laboratorio de Neurofarmacología del Instituto Cajal (Tabla 3). La selección de las secuencias peptídicas antigénicas se hizo teniendo en cuenta que no presentaban homología de aminoácidos consecutivos con otras secuencias de proteínas conocidas (*EMBL*, *GenBank* y *SwissProt*). Los péptidos incluían una cisteína en su extremo N-

terminal para su acoplamiento a la proteína transportadora hemocianina vía MBS (malimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster). Para los ensayos de inmunoprecipitación los anticuerpos se marcaron con biotina (21217, *ThermoScientific*).

Todos los anticuerpos generados se habían caracterizado por inmunodetección (*Western Blot, WB*) previamente en el laboratorio (Garzón y col., 2005c; Garzón y col., 2005d; Rodríguez-Muñoz y col., 2011; Rodríguez-Muñoz y col., 2012).

Proteína	Nº acceso NCBI	Epítipo	Aplicación
HINT1	NP_032274.1	GYRMVVNEGADGGG Aa 93-106	WB (1:3000)
MOR1	AAB60673	LENLEAETAPLP Aa 387-398, Ct	WB (1:3000)
MOR1	AAB60673	TKYRQGSID Aa 208-216, 2EL	IP (biotinado)
NR1	NP_032195.1	KFGTQERVNNSNKK Aa 482-496, Nt	IP (biotinado)
RGSZ2	AAF05758	NSQIYKAFVESTTS Aa 192-215, Ct	WB (1:3000)

Tabla 3. Secuencias de los péptidos utilizados para generar los anticuerpos de interés, junto con los números de acceso NCBI de las proteínas correspondientes y la aplicación y dilución de trabajo de cada anticuerpo. Ct: extremo carboxilo terminal; EL: bucle extracelular; IP: inmunoprecipitación; Nt: extremo amino terminal; WB: *western-blot*.

También se emplearon anticuerpos comerciales: anti-CaM (05-173, *Merck-Millipore, España*); anti-GSK3 β (9315, *Cell Signaling*); anti-GSK3 β P-S9 (9336, *Cell Signaling*); anti-GSK3 β P-Y216 (ab75745, *Abcam*); anti-GST (2622, *Cell Signaling*); anti-HINT2 (H00084681-01, *Abnova*); anti-NR1 (MAB1586, *Merck-Millipore*); anti-NR1C1 (AB5046P, *Merck-Millipore*); anti-NR2A (ab14596, *Abcam*), anti-NR2B (ab14400, *Abcam*); anti-RGSZ2 (PA1-25695, *ThermoFisher Scientific*); anti-teneurina 1 (NBP2-41315, *Novus Biologicals*); anti- σ 1R (42-3300, *Invitrogen*); anti-SUMO1 (BML-PW9460, *Enzo*); anti-SUMO-2/3 (BML-PW9465, *Enzo*); anti-TRPA1 (PAB11992, *Abnova*).

Como anticuerpos secundarios se utilizaron: anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina para detección colorimétrica (IgGs anti-conejo, S3731, *Promega*; IgGs anti-ratón, S3721, *Promega*) y anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano para la detección

por quimioluminiscencia (reactivo frente a cadenas ligeras Kappa de IgGs de conejo: anticonejo, *MAB201P*, Millipore; reactivos frente a las cadenas pesadas y ligeras de IgGs de conejo, ratón o cabra: anti-conejo, 7074, *Cell Signaling*; anti-ratón, 7076, *Cell Signaling*; anti-cabra, *V805A*, Promega).

1.3. Proteínas recombinantes

1.3.1. Proteínas recombinantes comerciales

Para la realización de ciertos ensayos *in vitro* se emplearon algunas proteínas recombinantes comerciales acopladas a agarosa, a glutatión S-transferasa (GST), o sin tag: CaM-agarosa 4B (*17-0529-01*, GE Healthcare); SUMO1-agarosa (*UL-740*, Boston Biochem); SUMO2-agarosa (*UL-755*, Boston Biochem); GST-RanGAP1 (*BML-UW9755*, Enzo); GST-SP100 (*BML-UW9825*, Enzo); CaM (*208670*, Calbiochem); HINT1 (*ab87362*, Abcam).

1.3.2. Proteínas producidas en el laboratorio: diseño y síntesis de primers

En el laboratorio se generaron y purificaron gran parte de las proteínas recombinantes necesarias para los experimentos, siguiendo el protocolo detallado en el apartado 2.7. de los métodos. Las proteínas purificadas fueron: HINT1 WT y sus mutaciones; HINT2; HINT3; MOR Ct; NR1 C0/C1/C2; RGSZ2; ICD teneurina 1; TRPA1 Nt y Ct; TRPM8 Nt; TRPV1 Nt y Ct y $\sigma 1R$.

Se diseñaron los primers adecuados para la expresión de estas proteínas recombinantes en *Escherichia coli* mediante el clonaje en el vector pFN2A (GST) Flexi® Vector (*C8461*, Promega) o pFN18A (HaloTag) T7 Flexi® Vector (*G2751*, Promega). También se sintetizaron primers para la expresión de los mutantes puntuales de la HINT1. Con el programa informático *Lasergene* (DNASTAR, Madison, Estados Unidos) se analizó la probabilidad de los primers de formar horquillas y dímeros que pudieran interferir en la amplificación de la secuencia, además de determinar su temperatura óptima de hibridación. Los primers empleados para la producción de las proteínas recombinantes y para los mutantes puntuales de la HINT1 se muestran en las Tablas 4 y 5, respectivamente.

Proteína	Nº acceso NCBI	Primers	Vector
HINT1	NM_008248.2	5'- GGCTGCGAT/CGCCGCTGACGAGATTGCCAAG -3' 5'- GTCGGTTT/AAACACCAGGAGGCCAGTTCATCT -3'	pFN18A
HINT2	NM_026871.1	5'- GGGCGCGAT/CGCCGCTGCTGCTGTGCTGCTGGCCG -3' 5'- TTGTGTTT/AAACGCCAGGTGGCCACTGCAGCTGT -3'	pFN18A
HINT3	NM_025798.3	5'- GGCTGCGAT/CGCCGCTGAGAAGCAAGCGGGCTTGG -3' 5'-ATTAGTTT/AAACTTTTCTTAGTTTTTCAAGCAAGTAATCAACT -3'	pFN18A
MOR1 _{Ct}	AF400247.1	5'- AGGAGCGAT/CGCCGCTGTATTTATTGTCTGCTGGACC -3' 5'- GCGAGTTT/AAACGGGCAATGGAGCAGTTTCTGCTT -3'	pFN18A
NR1 C0/C1/C2 _{Ct}	NM_008169	5'- TAAAGCGAT/CGCCGGGATCTTCCTCATT-3' 5'- GTCGGTTT/AAACTCAGCTCTCCCTATG -3'	pFN2A
RGSZ2	NM_019958.4	5'- GACCGCGAT/CGCCAGAAAACGGCAGCAGTCACA -3' 5'- GATGGTTT/AAACTTAGGATTCAGAAGTACAGCTGGTG -3'	pFN2A pFN18A
ICD teneurina-1	NM_011855	5'- TTGTGCGAT/CGCCGAGCAAACAGACTGCAAACCT -3' 5'- GGGCGTTT/AAACCTTCCAATTGCAGCATCTGT -3'	pFN18A
TRPA1 _{Nt}	NP_808449	5'- GACCGCGAT/CGCCAAGCGCGCTTGAGGAGGATTCT-3' 5'- GTCGGTTT/AAACATGGGCTCTGAATCCATAGGCACACCA -3'	pFN18A
TRPA1 _{Ct}	NP_808449	5'- GACCGCGAT/CGCCATTGGCTTGGCGTTGGGGACA -3' 5'-GCAGGTTT/AAACAAAAGTCCGGGTGGCTAATAGAACAATGTG -3'	pFN2A
TRPM8 _{Nt}	NP_599013	5'- TCAGGCGAT/CGCCGGCTACACGGTAGGCATTGTACAG -3' 5'- GACGGTTT/AAACCTTGATGTTATTAGCAATCTTTTCAGAAGAC-3'	pFN18A
TRPV1 _{Nt}	NP_542437	5'- AGCTGCGAT/CGCCGAGAAATGGGCTAGCTTAGACT -3' 5'- GTCGGTTT/AAACGCGCTTGACAAATCTGTCCC -3'	pFN18A
TRPV1 _{Ct}	NP_542437	5'- CCCGGCGAT/CGCCAACAAGATTGCACAAGAGAGCAAGAACAT -3' 5'- GTGCGTTT/AAACTTCTCCCCGGGCCATGGAAT -3'	pFN2A
σ1R	AF004927	5'- ATTGGCGAT/CGCCCCGTGGGCCGCGGGACGG -3' 5'- ATTAGTTT/AAACGGAGTCTTGCCAAAAGAGGTAG-3'	pFN18A

Tabla 4. Primers empleados en la amplificación de secuencias para la producción de las proteínas recombinantes. A la izquierda aparece la proteína o fragmento de la proteína a producir con el número de acceso de su ARNm correspondiente, en la parte central los *primers* empleados, indicando inicialmente el *primer* sentido y después el antisentido. Las secuencias subrayadas se corresponden con las dianas de restricción y el símbolo / indica el sitio de corte de las endonucleasas. Finalmente, se indica el vector utilizado para el clonaje del inserto y posterior expresión en *Escherichia coli*. Ct: extremo carboxilo terminal; Nt: extremo amino terminal.

Mutación puntual de la HINT1	Primer
HINT1 T17A	5'- GCCCAGCCCGGCGGCGACGCGATCTTCGGCAAGATC -3' 5'- GATGATCTCGCCGAAGATCGCGTCGCCGCC -3'
HINT1 F33S	5'- CCCCGCCAAGATCATCTCCGAGGACGACCGGTGTC-3' 5'- AGCAAGACACCGGTCGTCTCGGAGATGATCTTGGCGGGGAT -3'
HINT1 E34K	5'- CCCGCCAAGATCATCTTCAAGGACGACCGGTGTCTT -3' 5'- GTCATGAAAAGCAAGACACCGGTCGTCTTGAAGATGATCTTGGCGGGG -3'
HINT1 R37P	5'- ATCTTCGAGGACGACCCGTGTCTTGTCTTTTC -3' 5'-GTCATGAAAAGCAAGACACGGGTCGTCTCG -3'
HINT1 C38R	5'- TTCGAGGACGACCGGCGTCTTGTCTTTTCATGACATTTCCCCT -3' 5'-TGCTTGAGGGGAAATGTCATGAAAAGCAAGACGCGGTCGTCTCCT -3'
HINT1 C38S	5'- GAGGACGACCGGAGTCTTGTCTTTTCATGACATTTCCCCT -3' 5'- AAAAGCAAGACTCCGGTCGTCTCGAAGATGATCTTGGCGGG -3'
HINT1 H51R	5'- CCTCAAGCACCAACACGCTTTCTGGTGATACCC -3' 5'- GGGTATCACCAGAAAGCGTGTGGTGCTTGAAGGGA -3'
HINT1 K57N	5'- ACACACTTTCTGGTGATACCCAACAAGCATATATCCCAG-3' 5'-AGAAATCTGGGATATATGCTTGTGGGTATCACCAGAAAGTGTGTTGG -3'
HINT1 C84R	5'- GGACATTTAATGATTGTTGGCAAGAAACGTGCTGCAGATCTGGGCCTG -3' 5'- CAGGCCAGATCTGCAGCACGTTTCTTGCCAACAATCATTAATGTCC -3'
HINT1 C84S	5'- GTTGGAAGAAAAGTGTGCAGATCTGGGCCTG -3' 5'- CAGATCTGCAGCACTTTTCTTGCCAACAATCATTAAATGTCC -3'
HINT1 D87V	5'- CAAGAAATGTGCTGCACTTCTGGGCCTGAAG -3' 5'- CCCGCGTTCAGGCCAGAACTGCAGCACATTTCTTGCC -3'
HINT1 G89V	5'- GCTGCAGATCTGGTCTGAAGCGCGGGTACCGGATGG -3' 5'- TACCCGCGCTCAGGACCAGATCTGCAGCAC -3'
HINT1 G93D	5'- CTGGGCCTGAAGCGCGACTACCGGATGGTGG -3' 5'- CACCACCATCCGTTAGTCGCGCTTACGGCCAGATCT -3'
HINT1 V97M	5'- CTGAAGCGCGGGTACCGGATGATGGTGAATGAAGGTGCAGACGGG -3' 5'- CCCGTCTGCACCTTCATTCACCATCATCCGGTACCCGCGCTT -3'
HINT1 Q106*	5'- GGCTGCGAT/CGCCGCTGACGAGATTGCCAAG -3' 5'- GTGCGTTT/AAACTCCCCCGTCTCACCTTC -3'
HINT1 H112N	5'- GTCTATCACATTAACCTCCATGTCCTTGGGGGTCGG -3' 5'- ACCCCAAGGACATGGAGGTTAATGTGATAGACAGACTG -3'
HINT1 H114R	5'- GTCTATCACATTCACCTCCGTGTCCTTGGGGTTCGGCAGATG -3' 5'- CTGCCACCCCAAGGACACGGAGGTGAATGTGATAGAC -3'
HINT1 V115D	5'- CACCTCCATGACCTTGGGGTTCGGCAGATGAACTGG -3' 5'- ACCCCAAGGTCATGGAGGTGAATGTGATAGACAGA-3'
HINT1 L116Q	5'- CACCTCCATGTCCAAGGGGGTTCGGCAGATG -3' 5'- CCGACCCCTTGGACATGGAGGTGAATGTGATA -3'
HINT1 W123*	5'- GGCTGCGAT/CGCCGCTGACGAGATTGCCAAG -3' 5'- GTGCGTTT/AAACACCCCAAGGACTAGGAG -3'

Tabla 5. Primers empleados en la amplificación de secuencias para la producción de las mutaciones puntuales de la HINT1. A la izquierda aparece la mutación de la HINT1 y a la derecha los *primers* empleados, indicando inicialmente el *primer* sentido y después el antisentido. Las secuencias subrayadas se corresponden con las dianas de restricción y el símbolo / indica el sitio de corte de las endonucleasas; el codón mutado está resaltado en gris.

1.4. Drogas, compuestos e iones metálicos

- Ligandos del NMDAR: (+)-MK801 maleato (0924, Tocris Bioscience, Reino Unido); NMDA (0114, Tocris). Los compuestos se disolvieron en suero salino.

- Drogas varias empleadas en los test de comportamiento: D-anfetamina sulfato (2813, Tocris); ácido valproico (P4543, Sigma-Aldrich, España); citalopram hidrobromuro (1427, Tocris); amitriptilina clorhidrato (4456, Tocris). Los compuestos se disolvieron en suero salino.

- Inhibidor de la PKC: Gö7874 (365252, Calbiochem), se disolvió en una mezcla 1:1:18 (v/v/v) de etanol: Kolliphor EL (C5135, Sigma): suero salino.

- Inhibidor de la GSK3 β : TDZD8 (T8325, Sigma-Aldrich), se disolvió en una mezcla 1:1:18 (v/v/v) de etanol: Kolliphor EL (C5135, Sigma): suero salino.

- Ligandos del σ 1R: BD1047 (0956, Tocris); BD1063 (0883, Tocris); 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-yl]oxi]etil] morfolina (S1RA) (16279, Cayman Chemical, Estados Unidos); progesterona (P7556, Sigma-Aldrich); pregnenolona sulfato (P162, Sigma-Aldrich); (\pm)-PPCC oxalato (3870, Tocris); PRE084 (0589, Tocris). Los compuestos empleados en los experimentos de comportamiento se disolvieron en salino excepto el PPCC que se disolvió en una mezcla 1:1:18 (v/v/v) de etanol: Kolliphor EL (C5135, Sigma): suero salino. Por otro lado, aquellos utilizados en los experimentos *in vitro* se prepararon en tampón salino excepto la pregnenolona sulfato que se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO).

- Ligandos de la HINT1: el inhibidor no-competitivo carbamato guanosina-5'-triptamina (TpGc) y el sustrato AMP triptamina fosforamidato (TpAd). Ambas sustancias fueron sintetizadas por el Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC CSIC, Barcelona, España). Estos compuestos se prepararon en DMSO.

- Donador de NO: S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) (487910, Merk-Millipore); se disolvió en tampón salino.

- Quelante de iones: N,N,N',N'-tetrakis (2-piridilmetil) etilenediamina (TPEN) (616394, Merck-Millipore); se disolvió en DMSO.
- Sales de cloruro de metales divalentes: CuCl₂ (102739, Merck-Millipore); MgCl₂ (M8266, Sigma); MnCl₂ (805930, Merck-Millipore); NiCl₂ (106717, Merck-Millipore); ZnCl₂ (39059, Sigma). Los compuestos se disolvieron en agua.
- Agonista opioide Mu: morfina sulfato (Merck, Darmstadt, Alemania), se disolvió en suero salino.
- Agonista del TRPA1: formalina (FO0011005P, Scharlau, España), se disolvió en suero salino.

2. Métodos

2.1. Administraciones intracerebroventricular (icv), intraperitoneal (ip) e intraplantar (ipl)

Algunos compuestos se administraron vía icv con el fin de asegurar su presencia a nivel supraespinal y solventar su escasa permeación a través de la barrera hematoencefálica. Para ello, los ratones se anestesiaron ligeramente con isoflurano 1,5 % (Isoba®Vet, Schering-Plough, Reino Unido) (en 70 % N₂O, 30 % O₂) y después, mediante una jeringa Hamilton de 10 µL, se procedió a inyectar en el ventrículo lateral derecho en un punto que dista 2 mm hacia la zona caudal y 2 mm hacia la zona lateral de la bregma, a una profundidad de 3 mm. Todas las administraciones se realizaron en un volumen de 4 µL de solución, que fue infundida a una velocidad de 1 µL cada 5 segundos. Tras esto, la aguja se mantuvo durante 10 segundos adicionales.

Las drogas con una conocida capacidad de paso de la barrera hematoencefálica, como la anfetamina y el valproato, se administraron por vía ip, a una dosis de 10 ml/kg de peso del animal. La formalina se inyectó por vía intraplantar a una dosis de 0,5 % en un volumen de 20 µl para producir un modelo de hipersensibilidad dolorosa periférica.

2.2. Test de comportamiento

Paso previo a los ensayos de comportamiento, los animales se habituaron durante una hora al día, dos días consecutivos, a la sala dónde se iban a realizar los experimentos.

Luego, el día del ensayo los ratones se transfirieron a la sala 30 minutos antes de comenzar la prueba. Para excluir posibles cambios comportamentales causados por la experimentación previa, cada test se realizó con una cohorte diferente de animales. Con el fin de reducir el riesgo de estrés social, los ratones de la misma camada constituyeron un mismo grupo.

2.2.1. Estudio de la actividad motora espontánea: test de campo abierto

Este ensayo se llevó a cabo en cámaras automáticas *Accuscan activity analyzer - VersaMax 260 v2.4 (Omnitech Electronics, Inc., Estados Unidos)* de 42 x 42 x 30 cm (largo x ancho x alto), colocadas en el interior de un marco dotado de células fotoeléctricas; la interrupción de los haces de luz de cada cámara se monitorizó y analizó con el software *VersaMax* y *VersaDat (Omnitech Electronics, Inc.)*. Las cámaras se dividieron en 4 cuadrantes usando dos láminas transparentes dispuestas en cruz, formando un ángulo de 90 ° entre ambas.

En cada experimento se introdujeron dos ratones por cámara, uno en el cuadrante inferior izquierdo y otro en el superior derecho, registrándose su actividad locomotora espontánea durante 100 minutos. Los parámetros analizados fueron: la actividad horizontal, la actividad vertical y el tiempo en el centro (en segundos).

2.2.2. Test de actividad en rodillo: rotarod

En esta prueba se evaluó la coordinación motora de los animales. Se situó al animal sobre un rodillo giratorio (*Ugo Basile, Italia*) de 3 cm de diámetro. A cada ratón se le sometió a 6 sesiones con aceleración constante, de 3 minutos cada sesión y con un intervalo de 20 minutos entre pruebas. Este protocolo se repitió durante 3 días consecutivos.

En el rodillo se colocaron cuatro animales por tanda, separados por divisores opacos, y se les evaluó de manera simultánea, registrándose el tiempo desde el inicio de la prueba hasta la caída del ratón a la placa inferior, lo que detenía el temporizador individual de cada sección.

2.2.3. Test del residente-intruso

Este ensayo se emplea para evaluar la agresividad asociada a la conducta maniaca (Einat, 2007). Los animales residentes se estabularon individualmente y no se cambiaron de caja durante la semana previa al test. En el día de la prueba, los ratones se transfirieron a la sala experimental en sus cajas habituales, y tras los 30 minutos del periodo de adaptación, el intruso, un macho joven de la misma cepa, se introdujo en la caja de cada animal residente. El ratón intruso sólo se empleó una vez. A continuación, se registró el comportamiento del ratón residente durante 10 minutos, anotándose únicamente las conductas de interacción entre ambos animales. La tasa de agresión de cada ratón residente se calculó como el porcentaje de conductas agresivas respecto al número total de interacciones. Para minimizar los daños de los ratones, éstos se separaron brevemente tras cada ataque. Al final de la sesión, el intruso se sacó de la caja y ambos ratones volvieron a la habitación de estabulación.

2.2.4. Test de preferencia de soluciones azucaradas

Para la realización de esta prueba, se colocó en la jaula de los ratones un bebedero adicional con una solución de sacarosa al 1 % (107687, *Merck-Millipore*) que se mantuvo durante 48 horas, además de la comida y el agua habituales, que no se habían eliminado previamente al test. La concentración de sacarosa fue la elegida en los estudios anteriores realizados en animales BStac (Flaisher-Grinberg y col., 2009). Al principio del ensayo, y luego cada 24 horas, se midió el peso de las botellas de solución azucarada y de agua. Además, para evitar un posible efecto de preferencia de la botella por localización, se alternó su ubicación cada 12 horas. La preferencia por sacarosa se calculó como el porcentaje de la solución azucarada consumida relativa al volumen total de líquido consumido.

2.2.5. Test de natación forzada

Esta prueba está basada en el test de Porsolt (Porsolt y col., 1977) que permite evaluar la eficacia de fármacos antidepresivos. Más recientemente, el test de la natación forzada también se ha empleado para detectar conductas tipo manía (Hannah-Poquette y col., 2011; Juetten y Einat, 2012). Esta prueba se realizó en un tanque cilíndrico vertical de 25 cm de alto y 20 cm de diámetro, lleno de agua a 22 ± 1 °C. El ratón se ve obligado a

nadar para no ahogarse, ya que no alcanza el fondo ni hay ninguna plataforma o borde donde apoyarse. El test tuvo una duración de 6 minutos, siendo los 2 primeros minutos considerados pre-test, durante los cuales los animales se habituaron al entorno. Al final de la prueba, tras secar a los animales, se devolvieron a sus cajas de estabulación. El agua del tanque se cambió después de cada sesión. El tiempo de inmovilidad que se evaluó fue el cómputo de los segundos de los últimos 4 minutos del test en los que los animales no exhibieron conductas activas, como nadar y luchar, sino que únicamente realizaron los movimientos mínimos para mantener la cabeza a flote.

2.3. Modelo de dolor neuropático: lesión por constricción crónica del nervio ciático (*chronic constriction injury, CCI*)

La técnica quirúrgica se basó en el procedimiento descrito por Bennet y Xie (1998). Los animales se anestesiaron por vía inhalatoria con una mezcla de isoflurano/oxígeno (2,5 % de isoflurano y flujo de oxígeno a 0,5 L/min). Se realizó una incisión de aproximadamente 0,5 cm en el muslo de la pata trasera derecha, separando el bíceps femoral para localizar la parte más próxima a la trifurcación del nervio ciático. Se efectuaron 2 ligaduras con hilo de seda 5/0 (7004, *Lorca Marin, Murcia, España*) con una distancia aproximada de 1 mm entre ellas. Al terminar la cirugía, la incisión se suturó con hilo de seda *Ethicon* 4-0. La cirugía de los animales sham se realizó de manera similar, pero sin ligar el nervio ciático.

2.4. Ensayos de inmunoprecipitación

2.4.1. Obtención y preparación de las muestras

Grupos de 6-8 ratones se sacrificaron por decapitación para la extracción de sus estructuras cerebrales. Las muestras se recogieron con un tampón Tris-HCl 25 mM pH 7,5, sacarosa 0,32 M y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,25 mM, todo ello a 4 °C. El tejido resuspendido se disgregó con un homogeneizador *Polytron (PT10/35 Kinematica, Kriens-Luzern, Suiza)*.

A continuación, y siempre a 4 °C, se procedió a separar los componentes celulares del tejido homogeneizado en función de su tamaño y su densidad. Se centrifugó a 1.000 xg (*Sorvall RCSC, rotor SS34, Newton, CT, Estados Unidos*) durante 10 minutos, obteniéndose la sedimentación de los componentes de mayor tamaño, como los núcleos y

las células enteras (pellet 1, P1). El sobrenadante primero (S1), donde se localizan las membranas sinápticas, se centrifugó de nuevo durante 20 minutos a 20.000 xg para obtener la fracción rica en sinaptosomas (pellet 2, P2). Mediante la resuspensión del P2, y repitiendo el procedimiento de centrifugación, se eliminaron gran parte de los componentes celulares no sinaptosomales, El sedimento final se recuperó en tampón Tris-HCl 25 mM pH 7,5, PMSF 10 μ M y una mezcla de inhibidores de proteasas (P8340, Sigma) a una concentración de proteína de 3-5 μ g/ μ L (*Pierce Detergent Compatible Bradford Assay Kit, 23246, Thermo Scientific*) y se guardó a -80 °C hasta el momento de ser utilizado.

2.4.2. Inmunoprecipitación de proteínas

Las proteínas procedentes de la fracción de membranas P2 se solubilizaron en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, Nonidet NP-40 1 % (detergente no iónico), con una mezcla de inhibidores de proteasas (P8340, Sigma) y una mezcla de inhibidores de fosfatasas (cóctel 1: P2850, Sigma; cóctel 2: P5726, Sigma), siempre a 4 °C. Este solubilizado se sometió a 2 ciclos de sonicación de 10 segundos y se dejó en agitación a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, y para evitar la presencia en el paso final de este proceso de uniones inespecíficas entre la estreptavidina agarosa y las proteínas presentes en la muestra, se realizó un aclarado preliminar durante 1 hora a 4 °C con 30 μ L de estreptavidina agarosa (17-5113-01, GE Healthcare). A continuación, las muestras se centrifugaron 5 minutos a 4.300 xg y se descartó la estreptavidina agarosa precipitada. Los sobrenadantes obtenidos se incubaron, en agitación moderada, 18 horas a 4 °C en presencia de inmunoglobulinas G (IgGs) biotinadas dirigidas frente a las proteínas de interés.

Transcurrido este tiempo las muestras se incubaron de nuevo con estreptavidina agarosa (20 μ L por cada 200 μ g de proteína) durante 2 horas, esta vez con el fin de atrapar a las IgGs biotinadas junto con el material al que se hubiesen unido. Después se centrifugaron a 4.300 xg y se retiraron los sobrenadantes. Para eliminar el material que de forma inespecífica pudiera quedar en la estructura de la agarosa, los pellets formados por la agarosa que llevaba unida la proteína de interés se lavaron 4 veces, constando cada ciclo de lavado de una incubación de 15 minutos en 1 ml del tampón anterior seguido de centrifugación.

Los inmunocomplejos así obtenidos se disociaron de las IgGs con calor y el efecto de un detergente como el sodio dodecilsulfato (SDS), y se desnaturalizaron con la ayuda de β -mercaptoetanol. Así, las muestras se calentaron a 100 °C durante 10 minutos en un tampón Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol 25 %, SDS 2 %, azul de bromofenol 0,01 % (*Laemmli 2X Sample Buffer, 1610737, Bio-Rad*) con β -mercaptoetanol 5 %. Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron del complejo IgG-biotina-estreptavidina-agarosa mediante su filtración por centrifugación en filtros de 0,22 μ m de poro (*Ultrafree-MC UFC30GV0S, Merck-Millipore*). Este proceso separa antes a las proteínas unidas a las IgGs que a las propias IgGs de la estreptavidina unida covalentemente a la agarosa, minimizándose la presencia de IgGs en el paso final del análisis de las proteínas capturadas. El filtrado se analizó por SDS-PAGE (*SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*) en geles de acrilamida-bisacrilamida.

2.5. Electroforesis de proteínas y transferencia a soporte sólido: detección inmunológica (*western blot*)

Las muestras se solubilizaron en tampón de carga *Laemmli 2X* con β -mercaptoetanol 5 % en proporción 1:1 (v/v), y se calentaron a 100 °C durante 10 minutos. La combinación de un detergente aniónico como el SDS, un agente reductor como el β -mercaptoetanol y el calor permite minimizar la agregación y disociar las proteínas. Además, el tratamiento conjunto del SDS (separa uniones no covalentes) más el agente reductor (rompe puentes disulfuro) obtiene la estructura primaria de las proteínas, de manera que la longitud de la cadena, que refleja la masa, es la que determina la velocidad de migración en una SDS-PAGE. Así, en un gel isocrático (poro uniforme), las proteínas pequeñas adquieren una forma globular revestida de SDS y se desplazan rápidamente a través del gel, mientras que las más grandes atraviesan peor el poro y avanzan más lentamente. El peso molecular de una proteína se determina al final de la carrera comparando su distancia de migración con las obtenidas para una serie de proteínas de tamaño molecular conocido, los estándares (10-250 KDa: *Precision Plus Protein™ All Blue Standards, 161-0373, Bio-Rad*).

Para proteínas de bajo peso molecular se utilizaron geles comerciales Bis/Tris 4-12 % (*NuPAGE, NP0341, Invitrogen*), mientras que para proteínas de un peso molecular medio-alto se emplearon geles de 12 ó 10 % de acrilamida-bisacrilamida elaborados en el

laboratorio. Una vez que las proteínas de nuestra muestra se separaron, se obtuvo una imagen de la cromatografía transfiriendo las proteínas y conservando su situación mediante transferencia desde el gel a membranas de polivinil-difluoruro (PVDF) de 0,2 μm (*Immun-Blot PVDF Membrane, 162-0177, Bio-Rad*).

Tras la transferencia, se bloqueó la adsorción inespecífica de proteínas a los sitios de la membrana carentes de las proteínas transferidas. Este proceso evita que los anticuerpos que, a continuación, se incuban con la membrana se unan inespecíficamente a estos sitios dando imágenes falsas de presencia de la proteína diana y/o un fondo que dificulta el análisis de las señales específicas. Así, las membranas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con proteínas de leche deshidratada y deslipidada (*Blocker, 170-6404, Bio-Rad*) preparadas al 5 % en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 200 mM y Tween-20 0,05 % (TTBS).

La detección inmunológica de las proteínas se realizó en dos etapas: primero, la membrana donde estaban inmovilizadas las proteínas se incubó con el anticuerpo específico durante 12-48 horas a 4 °C en abierto o en cámaras de incubación (*PR150 Deca-Probe Incubation Manifold, Hoefer-GE Healthcare*). Seguidamente, se lavó la membrana con TTBS y se procedió a su incubación durante 2 horas con el anticuerpo secundario tipo anti-inmunoglobulina diluido 1:10.000 en TTBS. El anticuerpo secundario estaba acoplado a la enzima fosfatasa alcalina (*Promega*) o a la peroxidasa de rábano (*Horseradish peroxidase* o *HRP, Cell Signaling*) para un revelado cromogénico en el primer caso (*S3841, Promega*), o por quimioluminiscencia (*Clarity Western ECL Substrate, 1705061, Bio-Rad*) en el segundo.

Las imágenes se visualizaron mediante una cámara CCD empleando un sistema *ImageQuantTM LAS 500 (GE Healthcare)* y se analizaron por densitometría (*AlphaEase v3.2.2*). Una vez definida la zona de la membrana donde se quiere realizar el análisis, el sistema calcula automáticamente la exposición óptima, permitiendo obtener la máxima señal de nuestra proteína de interés para su posterior cuantificación. Para cada grupo de muestras, las inmunoseñales se midieron tomando como referencia el área de la señal más fuerte (media de la densidad óptica de los píxeles dentro del objeto $\text{área}/\text{mm}^2$; *AlphaEase FC software*). La media de los valores de gris de cada señal se normalizó con 8 bit/256 tonos de gris [(256-valor obtenido)/valor obtenido].

2.6. Análisis estadístico

Todas las gráficas y el análisis estadístico de los datos se elaboraron con el programa *Sigmaplot/SigmaStat v.14* (SPSS Science Software, Erkrath, Alemania). Las señales de los *western blots* se expresaron como el cambio relativo con respecto al control, al que se asignó un valor arbitrario de 1. Todos los datos experimentales se recogieron a partir de ensayos independientes y se compararon con sus controles mediante Análisis de la Varianza (ANOVA) seguido de test adecuados para detectar posibles cambios en las medias de los grupos de análisis, habitualmente test de Holm-Sidak o Dunnett de comparaciones múltiples. El efecto de TpGc y TpAd en la actividad isopeptidasa de la HINT1 se analizó mediante ensayos de competición de ligando con ajuste no lineal. El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$.

2.7. Producción de proteínas recombinantes

2.7.1. Obtención del ADN complementario como molde para PCR

Para la amplificación de las secuencias nucleotídicas se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction o RT-PCR*). La RT-PCR consta de dos fases, en la primera se retrotranscribe el ARN a su ADNc y en la segunda, usando el ADNc como molde, se amplifica la secuencia que se quiere estudiar mediante PCR.

Como primer paso para la obtención del ADNc, se aisló el ARN de cerebro de ratón utilizando TRIzol® (12183018A, Purelink® RNA Mini Kit, Invitrogen), una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que mantiene la integridad del ARN mientras lisa las células y disuelve los componentes celulares. A continuación, la adición de cloroformo seguida por una centrifugación a 12.000 xg durante 15 minutos a 4 °C separó la solución en dos fases, abajo una fase orgánica y, sobre ésta, una fase acuosa que contiene el ARN. Tras recoger la fase acuosa, se añadió la cantidad suficiente de etanol para conseguir una concentración final del 35 %. Seguidamente, se transfirió la solución a una columna Micro-to Midi® (12183018A, Purelink® RNA Mini Kit, Invitrogen) en la que, mediante lavados sucesivos, se eliminaron los contaminantes unidos al ARN, que finalmente se eluyó con agua libre de ARNasas. El ARN purificado se cuantificó, obteniendo la absorbancia a 260 nm y se evaluó su pureza mediante las ratios de

absorbancia a 260/280 nm y 260/230 nm, registrados con un espectrofotómetro *NanoDrop® 1000 (ThermoScientific)*.

Este ARN se empleó para la síntesis de ADNc, aunque previamente se trató con *ADNasaI* para la eliminación de cualquier posible contaminación por ADN genómico. Todo este procedimiento se realizó con el *Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (K1651, Thermo Scientific)*. En la mezcla de reacción de retrotranscripción se añadieron 2 µg de ARN, *primer* oligo (dT18) a una concentración final de 5 µM, tampón con sales (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, DTT 10 mM), mezcla de deoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) a una concentración de 1 mM, 20 unidades de inhibidor de ARNasa y 200 unidades de enzima transcriptasa reversa *Maxima H Minus* en un volumen final de 20 µL. La mezcla se incubó 30 minutos en un termobloque a 65 °C, seguida de 5 minutos a 85 °C para la inactivación de la transcriptasa.

2.7.2. Clonaje

Las regiones codificantes de las proteínas empleadas en el desarrollo de este trabajo (HINT1 WT y mutantes, HINT2, HINT3, MOR1 Ct, NR1 C0/C1/C2, RGS22, ICD teneurina 1, TRPA1 Nt y Ct, TRPM8 Nt, TRPV1 Ct y Nt, σ1R) se amplificaron mediante PCR en un termociclador *DNA Mastercycler (950000031, Eppendorf)* con ADN polimerasas recombinantes de alta fidelidad. Para la amplificación de las secuencias se empleó la ADN polimerasa termoestable *AccuPrime™ Pfx (12344-024, Invitrogen)*, que presenta actividad exonucleasa 3'→5'. Los *primers* empleados para la amplificación de las secuencias se muestran en las Tablas 4 y 5 del apartado 1.3.2. de materiales (página 64).

Los fragmentos del ADN amplificado se analizaron por electroforesis en gel de agarosa en tampón TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM); utilizando un marcador de ADN de 1 Kb (*SM1143, O'Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, Fermentas*) o 5 Kb (*SM1563, O'GeneRuler™ Express DNA Ladder, ready-to-use, Fermentas*). A continuación, si el producto de PCR estaba contaminado, se purificó el fragmento amplificado de interés del gel de agarosa con el sistema de extracción *Purelink® Quick Gel Extraction kit (K2100-12, Invitrogen)*, basado en la adsorción y desorción de ácidos nucleicos por una membrana de sílica en presencia de sales caotrópicas. El ADN purificado se digirió simultáneamente con las enzimas de restricción *SgfI* y *PmeI* durante

30 min a 37 °C. Pasado este tiempo, se purificó el producto de la digestión por cromatografía de adsorción con el *kit Purelink® PCR Purification (K310050, Invitrogen)* y se cuantificó con el espectrofotómetro *Nanodrop® 1000 (ThermoScientific)*.

Para la expresión en *E. coli* se eligieron los vectores pFN2A (GST) Flexi® Vector (C8461, Promega) o pFN18A (HaloTag) T7 Flexi® Vector (G2751, Promega) (Figura 17). Con el objetivo de insertar el fragmento de ADN amplificado en uno de los dos vectores, se linealizó el vector (500 ng) con SgfI y PmeI y se purificó con el *kit Purelink® PCR Purification (K3100-02, Invitrogen)*. A continuación, el inserto y el vector linealizado, ambos digeridos con las mismas enzimas de restricción (SgfI y PmeI), se unieron por sus extremos complementarios tras una incubación durante toda la noche a 4 °C en presencia de T4 ADN ligasa (EL0011, Fermentas). Para establecer la cantidad de inserto a utilizar en la reacción de ligación, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{masa del inserto (ng)} = \frac{\text{masa del vector (ng)} \times \text{tamaño del inserto (Kb)}}{\text{tamaño del vector (Kb)}} \times I/V$$

donde I/V es la relación molar inserto/vector.

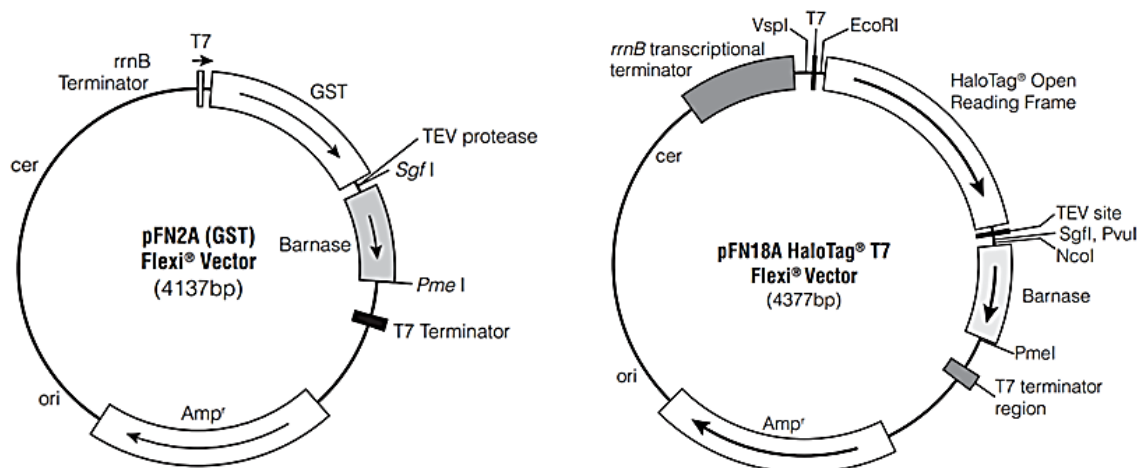


Figura 17. Vectores empleados para la expresión de las proteínas recombinantes. Los vectores pFN2A (C8461, Promega) y pFN18A (G2751, Promega) son muy similares. Las dianas de restricción de las enzimas SgfI y PmeI flanquean la secuencia de la barnasa, que de no eliminarse y ser sustituida por el inserto, resulta letal para la bacteria. Las enzimas SgfI y PmeI generan extremos cohesivos y romos respectivamente, evitando una incorrecta orientación del inserto.

2.7.3. Transformación y análisis de clones

Para la replicación de los plásmidos y posterior expresión de las proteínas recombinantes se utilizó la cepa bacteriana KRX (*L3002, Single Step KRX Competent Cells, Promega*), derivada de *E. coli* K12. Una alícuota de 50 µL de bacterias KRX se transformó con 5 µL de la mezcla de ligación y se incubó durante 20 minutos en hielo. Inmediatamente después, las bacterias se sometieron a un choque térmico a 42 °C durante 1 minuto, seguido por una incubación de 2 minutos en hielo. Tras atemperarse, sobre las bacterias se añadieron 950 µL de medio de cultivo LB (*Lysogeny Broth*) (extracto de levadura 0,5 %, triptona 0,1 %, NaCl 170 mM) y se incubaron 1 hora en agitación a 37 °C.

Con el fin de seleccionar las bacterias que habían incorporado el producto de la ligación, se plaquearon 100 µL de las muestras en placas de Petri con agar LB con ampicilina (100 µg/mL). Al día siguiente, se picaron de 5 a 10 colonias y se crecieron durante toda la noche en medio de cultivo LB-ampicilina en un agitador a 37 °C y 280 rpm. A continuación, se extrajo el ADN plasmídico de las células bacterianas en suspensión con el *kit* de minipreparación de plásmidos *GeneJet (K0503, ThermoScientific)*, basado en el procedimiento de lisis alcalina desarrollado por Birnboim y Doly (1979).

Para verificar la presencia del inserto en los constructos obtenidos, se digirió enzimáticamente el ADN plasmídico extraído con las enzimas utilizadas para introducir el gen de interés en el vector. Finalmente, en las instalaciones de Secugen S.L. en el Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid, España) se secuenciaron los constructos obtenidos para descartar la presencia de mutaciones en la secuencia y confirmar que el gen se había insertado respetando el marco de lectura.

2.7.4. Expresión

La cepa bacteriana KRX presenta en su genoma una copia del gen de la T7 ARN polimerasa, bajo el control del promotor de ramnosa (RhaPBAD). Este promotor está sujeto a represión catabólica por glucosa y se activa añadiendo ramnosa al medio, proporcionando un control preciso de la producción de T7 ARN polimerasa y, por tanto, de la expresión de la proteína recombinante.

Para la expresión de las proteínas utilizadas en este trabajo, se cultivó una colonia de bacterias transformadas con el ADN recombinante en medio líquido LB-ampicilina-glucosa (ampicilina 100 mg/L y glucosa 0,4 %) toda la noche a 37 °C y 280 rpm. A la mañana siguiente, el inóculo se diluyó 1:100 en más volumen de LB-ampicilina y se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica de 0,4-0,5, momento en el que se redujo la temperatura a 25 °C. Al obtener una densidad óptica de 0,5-0,6 se indujo la expresión de la proteína con la adición de ramnosa 0,1 %. Tras una incubación de 3 horas a 25 °C y 280 rpm, se centrifugaron las bacterias a 9.760 xg durante 15 minutos y los pellets obtenidos se congelaron a -80 °C.

2.7.5. Purificación

El pellet de bacterias congelado se resuspendió en tampón fosfato salino pH 7,3, Tritón 1 %, Tween 0,05 %, DTT 3 mM, PMSF 1 mM, lisozima 1 mg/mL en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (*P8465*, *Sigma-Aldrich*). En el caso de las proteínas purificadas con HaloTag, el tampón de extracción contenía HEPES 20 mM pH 7,5. El pellet resuspendido se mantuvo 15 minutos en hielo y se sonicó 2 min en ciclos de 5 segundos. En último lugar, se trató con ADNasaI 10 µg/mL (*10104159001*, *Sigma-Aldrich*) en MgSO₄ 5 mM durante 30 minutos con un ciclo de agitación cada 10 minutos.

Después de la extracción, los lisados bacterianos se centrifugaron a 43.150 xg durante 20 minutos. Se filtró el sobrenadante (*SCGVT05RE*, *Merck-Millipore*) para eliminar impurezas, y las proteínas fusionadas a GST se purificaron por cromatografía de afinidad mediante columnas de *Glutathion Sepharosa® 4 Fast Flow* (*17-5130-01*, *GE Healthcare*), o con resina no empaquetada *HaloLink™* (*G1912*, *Promega*) para las proteínas unidas a HaloTag. Cuando los experimentos requirieron el empleo de las proteínas con su *tag* se llevó a cabo la elución de los constructos GST-proteína con 10 mM de glutatión reducido.

2.7.6. Corte proteolítico con la proteasa TEV

La proteasa proTEV (*V6051*, *Tobacco Etch Virus*, *Promega*) se utilizó para cortar el *tag* de GST o HaloTag fusionado a las proteínas recombinantes. La enzima TEV reconoce una secuencia específica de 7 aminoácidos (ENLYFQG) localizados en el extremo 5' del sitio de clonaje de ambos vectores. De esta forma, la proteasa corta la secuencia

aminoacídica dejando el GST/HaloTag unido a la resina y la proteína de interés en el tampón.

Después de la unión del constructo a la resina correspondiente y de su lavado para arrastrar las impurezas unidas junto a la proteína de interés, se equilibró la resina con el tampón apropiado para el funcionamiento de la enzima: HEPES 50 mM pH 7,3, EDTA 0,5 mM, DTT 1 mM. Para el corte se emplearon 200 unidades de proteasa TEV disuelta en el tampón anterior, que se introdujeron en la columna de GST con ayuda de una jeringa de 1 mL, o se añadieron a la resina no empaquetada *HalolinkTM*. La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente haciendo recircular el tampón cada 15 minutos durante 2 horas en la columna de GST, o 3 horas en rotación para las proteínas con HaloTag. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó la resina con 30 mL del tampón anterior que se recogieron junto con el volumen de tampón en el que se había realizado el corte. El GST que había quedado dentro de la columna tras el corte se eluyó con el tampón de elución: Tris-HCl 50 mM pH 8, DTT 1 mM y glutatión L-reducido 20 mM.

2.7.7. Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución

Con el fin de minimizar la presencia de los contaminantes obtenidos junto a las proteínas recombinantes cortadas con la proteasa TEV, éstas se sometieron a un segundo proceso de purificación: la cromatografía de intercambio aniónico. Esta técnica permite la separación de iones y moléculas polares como las proteínas en función de sus propiedades de carga. La cromatografía de intercambio aniónico implica la unión de las moléculas cargadas negativamente (aniones) de la muestra a los grupos funcionales cargados positivamente de la matriz.

Las proteínas recombinantes obtenidas tras el corte con la TEV estaban contaminadas por la propia proteasa. Con las curvas de titulación de las proteínas obtenidas con el programa informático *Protean (DNASTAR)* observamos que la TEV posee un punto isoeléctrico de 9,3 mientras que todas las proteínas del estudio presentan un punto isoeléctrico menor. Utilizamos un tampón a cuyo pH nuestra proteína de interés tiene una carga neta negativa y la TEV carga positiva, la matriz cargada positivamente une nuestra proteína, mientras que la TEV se elimina al pasar libremente por la columna. El procedimiento requiere el intercambio del tampón en el que estaba la proteína por el tampón necesario para la cromatografía aniónica; en este paso se emplearon las *PD-10*

Desalting Columns (17-0851-01, GE Healthcare). A continuación, la muestra se inyectó en el cromatógrafo *Biologic DuoFlow Chromatography system (4006229, Bio-Rad)* acoplado a una columna de intercambio aniónico (*780-0001 Enrich Q, Bio-Rad*), que en presencia del tampón elegido su matriz se carga positivamente. Nuestra proteína, que en este tampón se carga negativamente, queda retenida por su interacción con la matriz y, tras lavar la columna para eliminar lo no unido específicamente, las proteínas que estuviesen retenidas se eluyeron con un gradiente de 0 a 1 M de NaCl y las fracciones obtenidas se analizaron mediante *western blot*.

Las fracciones enriquecidas en nuestra proteína de interés se concentraron y se les intercambió el tampón a Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, DTT 1 mM con las *PD-10 Desalting Columns (17-0851-01, GE Healthcare)*. En caso preciso, se realizó un paso adicional de purificación mediante electroelución tras separar las proteínas así obtenidas mediante SDS-PAGE. Como paso final, la proteína purificada se fraccionó y se redujo la presencia de oxígeno mediante la adición de argón, guardándose a -80 °C. El almacenamiento de las proteínas en una atmósfera inerte de argón reduce la aparición de agregados proteicos no funcionales causados por el efecto oxidativo del oxígeno.

2.8. Ensayos de interacción *in vitro* de proteínas recombinantes (*pull-down*)

Los ensayos de interacción se realizaron utilizando por una parte, una proteína recombinante fusionada a GST (NR1, TRPA1 Ct, TRPV1 Ct) o cortada del HaloTag (TRPA1 Nt, TRPM8 Nt, TRPV1 Nt) y unidas covalentemente a NHS-agarosa (*NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, 17-0906-01, GE Healthcare*), y, por la otra, proteínas recombinantes a las que previamente se había eliminado el *tag*. Para descartar la posibilidad de uniones específicas entre la proteína sin *tag* y la agarosa o el GST fusionado a las ancladas, las proteínas sin *tag* se incubaron con *Sepharose 4B (17-0120-01, GE Healthcare; control negativo)*, con GST recombinante en los casos requeridos (*Z02039, GenScript Co.; control negativo*) o junto con la proteína anclada correspondiente. En otros experimentos *in vitro* las interacciones tuvieron lugar entre proteínas recombinantes comerciales acopladas a agarosa (CaM-agarosa, SUMO1/2-agarosa) o proteínas recombinantes fusionadas a GST (GST-RanGAP1, GST-HINT1, GST- σ 1R) y proteínas sin *tag*.

En algunos casos, RGSZ2, ICD de teneurina 1 y MOR Ct se mantuvieron unidas a HaloTag y acopladas a resina *HaloLink*TM, y los ensayos de interacción se realizaron entre ellas y proteínas sin *tag*, que se incubaron además con HaloTag recombinante (control negativo) y con resina *HaloLink* (control negativo).

Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo en 300 µL de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) 0,2 % y en presencia o ausencia de CaCl₂ 2,5 mM. En los experimentos en los que se empleó CaM acoplada a agarosa o sin *tag*, el tampón se cambió a Tris-HCl 50 mM pH 7,5, DTT 1 mM y presencia o ausencia de CaCl₂ 2,5 mM. En todos los experimentos *in vitro* la proteína anclada se empleó a 100 nM y la proteína sin *tag* a 200 nM; la co-incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente 30 minutos con agitación mediante rotación suave. Transcurrido este tiempo y en los experimentos en los que se empleó una proteína acoplada a GST y otra sin *tag*, se añadió a la solución 40 µL de glutatión agarosa (17-0756-01, GE Healthcare) para la captura de la proteína fusionada a GST, y se prolongó la incubación 30 minutos más. Después de la(s) incubación(es), los viales se centrifugaron y los pellets obtenidos se lavaron tres veces con 300 µL del tampón del experimento en un filtro con tamaño de poro de 0,22 µm (*Ultrafree-MC 0.22 µm Centrifugal Filter Units, UFC30GV00, Merck-Millipore*). El último precipitado se solubilizó en el tampón de carga *Laemmli 2X* para su análisis por SDS-PAGE.

Con el objetivo de estudiar el efecto de diferentes drogas en las interacciones *in vitro*, después de la primera incubación conjunta de las dos proteínas en estudio, se realizó una segunda incubación de 30 minutos en las condiciones previas, incorporando concentraciones crecientes del compuesto de interés. Si la droga requería su preparación en DMSO, la concentración final de este solvente en el tampón de ensayo no superó el 1 %, para así evitar alteraciones en las interacciones entre proteínas. Tras la incubación, los precipitados obtenidos se sometieron a los mismos protocolos de lavado y elución descritos anteriormente.

2.9. Ensayos *in vitro* de sumoilación y desumoilación

La sumoilación es una modificación postraducciona l que conlleva la adición covalente de una o varias moléculas de SUMO en la proteína diana. Es un proceso catalizado por 3 enzimas distintas (E1, E2, E3) que actúan en pasos secuenciales. La

enzima E1 activa el extremo C-terminal del SUMO maduro, formándose un complejo transitorio SUMO-AMP que, posteriormente, rompe para unir ella misma SUMO. En el segundo paso se transfiere el SUMO a la enzima E2 (Ubc9), que cataliza la formación de un puente isopeptídico entre el grupo carboxilo de la región C-terminal del SUMO y el grupo ϵ -amino de una lisina presente en la proteína diana. Aunque la ligasa E3 es necesaria para la sumoilación *in vivo* de las proteínas, en los experimentos *in vitro* el proceso puede realizarse sin esta enzima, ya que existen altas concentraciones de Ubc9, suficiente para el reconocimiento de los sustratos.

Los experimentos de sumoilación se realizaron con un *kit* de sumoilación comercial (*BML-UW8955, Enzo*). Cada ensayo se llevó a cabo en un volumen de 20 μ L que incluía 1 μ M de la proteína sustrato (GST-RanGAP1, control positivo; ICD teneurina 1; RGSZ2), las enzimas SUMO E1 a 100 nM y SUMO E2 a 2 μ M, y SUMO1 a una concentración de 50 μ M, en un tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 40 mM, ATP 10 mM, MgCl₂ 10 mM. Las mezclas de sumoilación se incubaron 1 hora a 37 °C. Con el fin de mejorar la actividad isopeptidasa de la HINT1, después del ensayo de sumoilación se llevó a cabo el intercambio del tampón de la reacción por el tampón de desumoilación Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 0,3 mM mediante dilución y concentración (*10.000 nominal molecular weight limit, Amicon Ultra-0.5, UFC5010BK, Merck-Millipore*).

El proceso de sumoilación es reversible por la acción de diferentes isopeptidasas, entre ellas las SENP, que cortan el enlace entre la proteína diana y el SUMO. Para los ensayos de desumoilación se incubó el sustrato sumoilado con 2 μ M de la HINT1 en presencia de la CaM a 6 μ M y CaCl₂ 2,5 mM, o en presencia del donador de NO SNAP a 100 μ M. La enzima SENP2 (*E-710, Boston Biochem*), preincubada con DTT 10 mM durante 15 minutos a temperatura ambiente para su activación, se empleó como control positivo de actividad SUMO proteasa. Las reacciones se incubaron 1 hora a 37 °C y se pararon con el tampón *Laemmli 2X* para su análisis posterior por SDS-PAGE.

Resultados

1. Animales HINT1^{-/-} como modelo del síndrome bipolar humano

Estudios previos han demostrado que los ratones deficientes en la proteína HINT1 presentan cambios comportamentales asociados a diferentes trastornos neuropsiquiátricos, incluyendo un menor grado de ansiedad y depresión, así como una mayor sensibilidad a psicoestimulantes (Barbier y col., 2007; Barbier y Wang, 2009; Varadarajulu y col., 2011). Esta parte del trabajo se ha centrado en la comparación de los comportamientos y aspectos moleculares de los ratones deficientes en la HINT1 (HINT1^{-/-}) con sus controles, los WT, así como con los ratones BStac, un modelo animal aceptado que reproduce ciertos aspectos de la manía. Además de analizar la conducta basal de estos animales, también se evaluó su respuesta comportamental y molecular a diferentes intervenciones farmacológicas.

En la observación inicial no se detectó ninguna diferencia significativa en los ratones KO de la HINT1 con respecto a sus congéneres WT en cuanto a apariencia, peso o parámetros morfológicos. A continuación, se analizaron la actividad y coordinación motoras de estos animales. Durante 90 minutos se monitorizaron los movimientos espontáneos de los ratones WT/KO de la HINT1 dentro de las cajas de registro del actímetro *VersaMax* (*AccuScan Instruments Inc.*), siendo cada interrupción de los haces de luz contabilizada como una unidad de movimiento.

En la Figura 18A se presentan los datos de los movimientos acumulados en intervalos de 15 minutos de los animales KO de la HINT1 y sus correspondientes controles, los WT. Los parámetros analizados fueron la actividad horizontal, la actividad vertical y el tiempo en el centro (en segundos). Los ratones HINT1^{-/-} mostraron una mayor actividad horizontal y vertical, permaneciendo más tiempo en la zona central del campo, lo que sugiere que desarrollan una menor ansiedad que sus controles WT. Estos datos concuerdan con un estudio realizado por el grupo de Wang en el que estos animales muestran una expresión reducida de conductas de tipo depresivas y de ansiedad en diferentes test (Barbier y Wang, 2009).

El test del rotarod permite estudiar la coordinación, condición física y actividad motora de los animales. Tanto los ratones WT como KO de la HINT1 se entrenaron durante 3 días consecutivos sobre el rodillo. La coordinación motora observada en ambos grupos fue muy similar, no se detectó ninguna alteración de la movilidad en los ratones deficientes en la HINT1 (Figura 18B), tal y como ya han publicado Seburn y

colaboradores (2014). Paradójicamente, se ha descrito que diversas mutaciones puntuales recesivas en la HINT1 son causantes de un tipo de neuropatía axonal con neuromiotonía asociada, denominada ARAN-NM (Zimon y col., 2012); sin embargo, los ratones KO de la HINT1 no presentan un fenotipo equivalente.

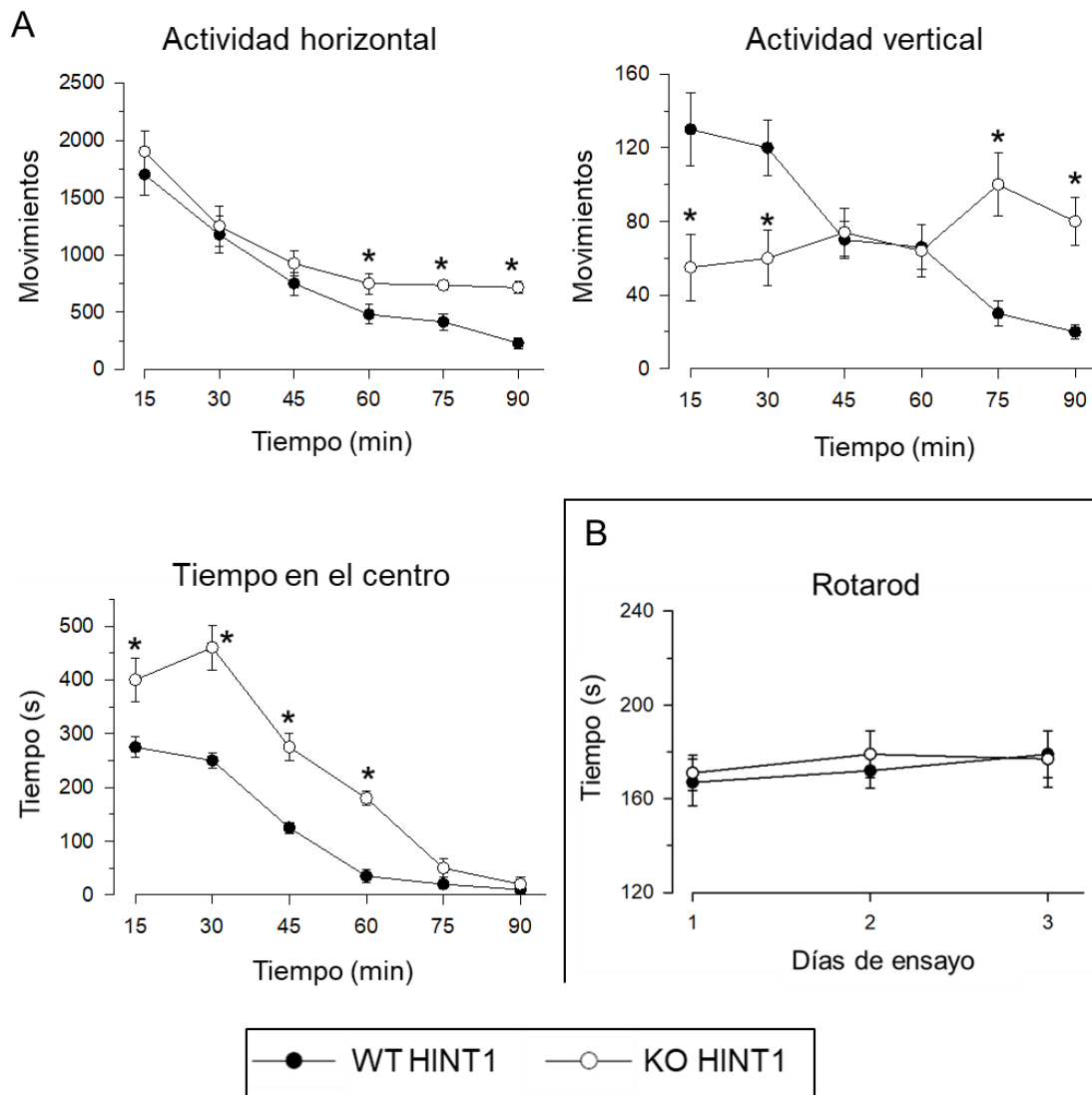


Figura 18. Estudio de la actividad motora espontánea y coordinación motora en ratones macho WT y KO de la HINT1. (A) En el actímetro se analizaron la actividad horizontal, la actividad vertical y el tiempo en el centro (en segundos) durante 90 minutos, a intervalos de 15 minutos. (B) En el rotarod se evaluó la condición física y coordinación motora de los ratones WT y KO de la HINT1, registrándose la latencia de caída en segundos desde el rodillo a la placa inferior. Las pruebas se realizaron en 3 días consecutivos, 6 test de 3 minutos cada uno al día, separados 20 minutos. Los valores corresponden a la media \pm ESM de grupos de 6 ratones de cada genotipo. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo WT HINT1. ANOVA, test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; $p < 0,05$.

1.1. Caracterización fenotípica de animales HINT1^{-/-} en los test de valoración de la conducta “maniaca”

A continuación, se realizaron una serie de pruebas conductuales elegidas previamente para la caracterización de los ratones BStac como modelo de manía. Así, se estudió la respuesta motora espontánea a psicoestimulantes, la preferencia a soluciones azucaradas, el test del residente-intruso y el test de la natación forzada. Dichas pruebas se realizaron en los ratones deficientes en la HINT1 en paralelo con los “maniacos” BStac, y los correspondientes animales control para cada cepa, los WT de la HINT1 y los BScr, respectivamente.

En primer lugar, se exploró en el actímetro la respuesta motora a psicoestimulantes, como la anfetamina. Espontáneamente, ambos tipos de animales BlackSwiss manifestaron una locomoción superior a los ratones WT/KO de la HINT1, pero la actividad horizontal de los BStac fue considerablemente más elevada que la de sus controles BScr (Figura 19). La administración de anfetamina vía ip a los 30 minutos de haber comenzado el test incrementó significativamente la actividad motora espontánea de los animales HINT1^{-/-} y BStac, mientras que su efecto fue menor en sus congéneres WT HINT1 y BScr, respectivamente.

Estudios previos han descrito que la inhibición de la quinasa GSK3 β reduce la hiperactividad inducida por anfetamina en los ratones “maniacos” BStac (Kalinichev y Dawson, 2011; Einat, 2014). En nuestros ensayos, la inhibición de la GSK3 β por el TDZD8 no atenuó los efectos de la anfetamina ni en los animales HINT1^{+/+} ni en los BScr, pero sí redujo los efectos de este psicoestimulante en los ratones KO de la HINT1 y en los BStac (Figura 19).

Por tanto, los ratones carentes de la proteína HINT1 desarrollaron hiperactividad motora frente a los psicoestimulantes, concretamente la anfetamina, y el inhibidor TDZD8 de la GSK3 β disminuyó este efecto. Este mismo patrón de comportamiento se observó en los animales “maniacos” BStac.

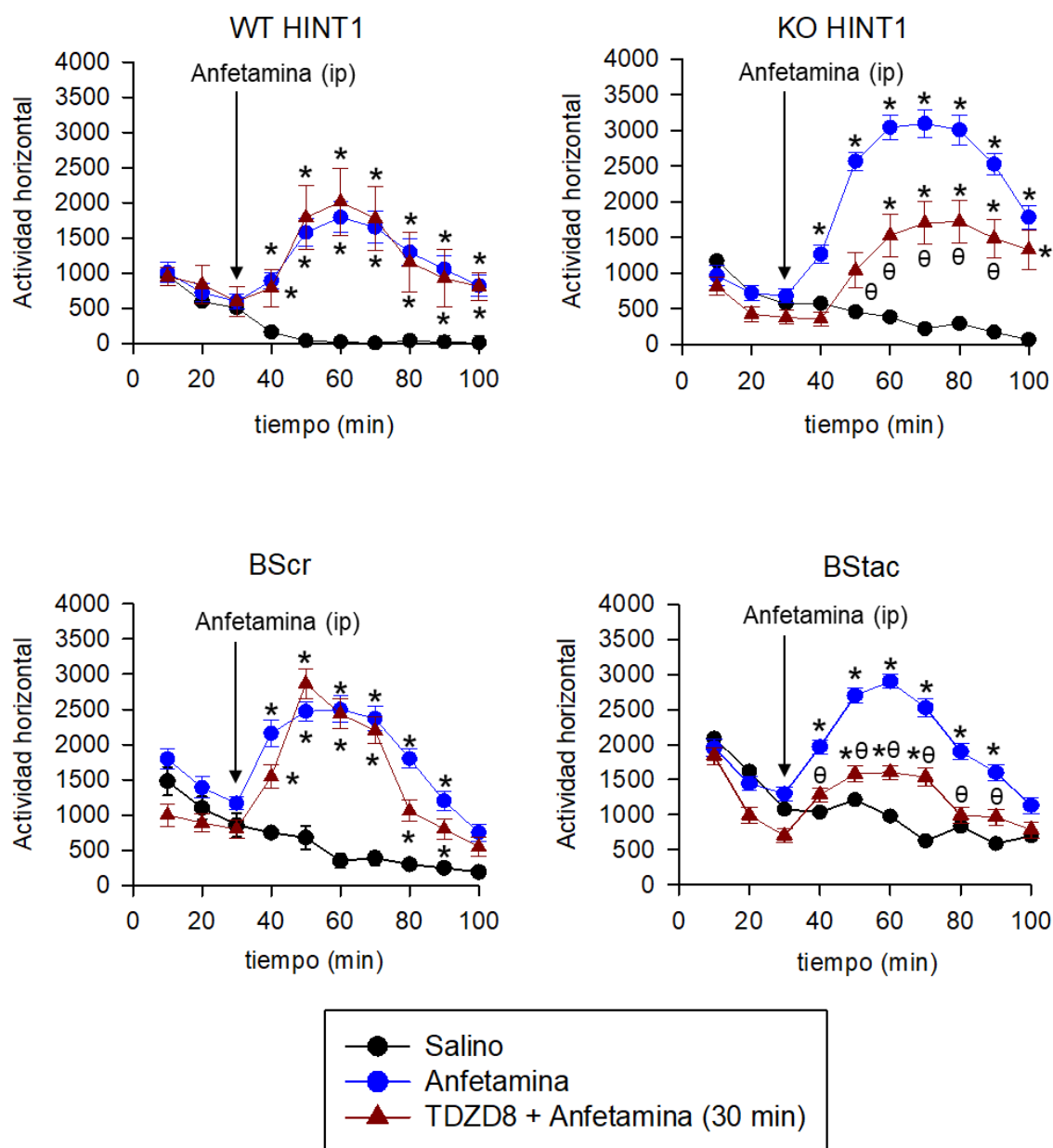


Figura 19. Influencia de la inhibición de la GSK3 β en la hiperactividad inducida por la anfetamina en los ratones WT/KO de la HINT1 y en los BScr/BStac. En los diferentes grupos de animales se analizó la actividad horizontal durante 100 minutos, a intervalos de 10 minutos. Los ratones habían sido pre-tratados (a tiempo 0) con salino o TDZD8 (20 nmol, icv). Pasados 30 minutos, los animales recibieron salino o anfetamina (2 mg/kg, ip) y se continuó el experimento hasta alcanzar los 100 minutos totales. Los valores corresponden a la media \pm ESM de grupos de 6 ratones de cada grupo. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control (salino). “ θ ” indica una diferencia significativa respecto al grupo que recibe anfetamina y salino, en vez de TDZD8. ANOVA, test Dunnett de comparaciones múltiples *versus* el grupo control; $p < 0,05$. Icv: intracerebroventricular; ip: intraperitoneal.

En otras cohortes de ratones WT/KO de la HINT1, de los BStac y de sus controles BScr se estudió la preferencia a soluciones azucaradas. En este test, los animales pueden consumir *ad libitum* agua o solución de sacarosa. De acuerdo con sus conductas

“ansiosas”, tanto los KO de la HINT1 como los BStac mostraron más preferencia por la solución azucarada que sus respectivos controles (Figura 20). En esta misma prueba se analizó el efecto del valproato, un estabilizador del ánimo, que se administró dos veces al día por vía ip. Este fármaco no alteró el consumo de la solución azucarada por los ratones HINT1 WT y BScr, pero sí redujo el de los animales HINT1^{-/-} y BStac hasta niveles iguales o inferiores al de sus respectivos grupos control (Figura 20). Por tanto, ambas cepas de ratones, KO de la HINT1 y los BStac, presentaron conductas hedonistas características del comportamiento maniaco que se corrigieron con el tratamiento de valproato.

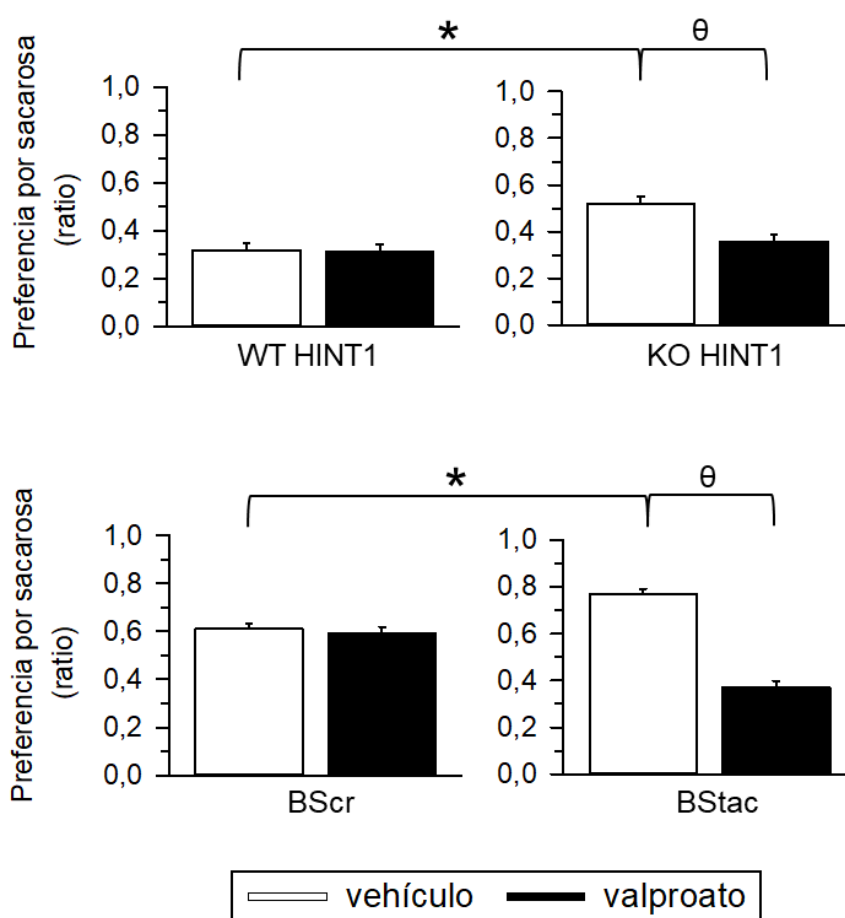


Figura 20. Preferencia por soluciones azucaradas de los ratones WT/KO de la HINT1 y de los BScr/BStac. La preferencia por sacarosa se indica como el porcentaje de la solución azucarada consumida relativa al volumen total de líquido consumido. El valproato (200 mg/kg) se administró por vía intraperitoneal dos veces al día. Los valores corresponden a la media \pm ESM de grupos de 6 ratones de cada grupo. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control. “ θ ” indica una diferencia significativa respecto al grupo sin valproato. ANOVA, test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; $p < 0,05$.

Un test empleado habitualmente para estudiar conductas “maniacas” es la prueba del residente-intruso, que proporciona un índice de la agresividad de los animales. Los

ratones KO de la HINT1 socializaron significativamente menos con el intruso que sus controles los WT y, cuando lo hicieron, fue de forma violenta, siendo este tipo de interacciones casi las únicas manifestadas por los animales deficientes en la HINT1 (Figura 21). La administración del valproato no modificó las conductas sociales de los ratones WT, y apenas incrementó las interacciones sociales de los ratones HINT1^{-/-}. Sin embargo, este estabilizador del ánimo redujo drásticamente las agresiones de los ratones KO de la HINT1 hacia los intrusos.

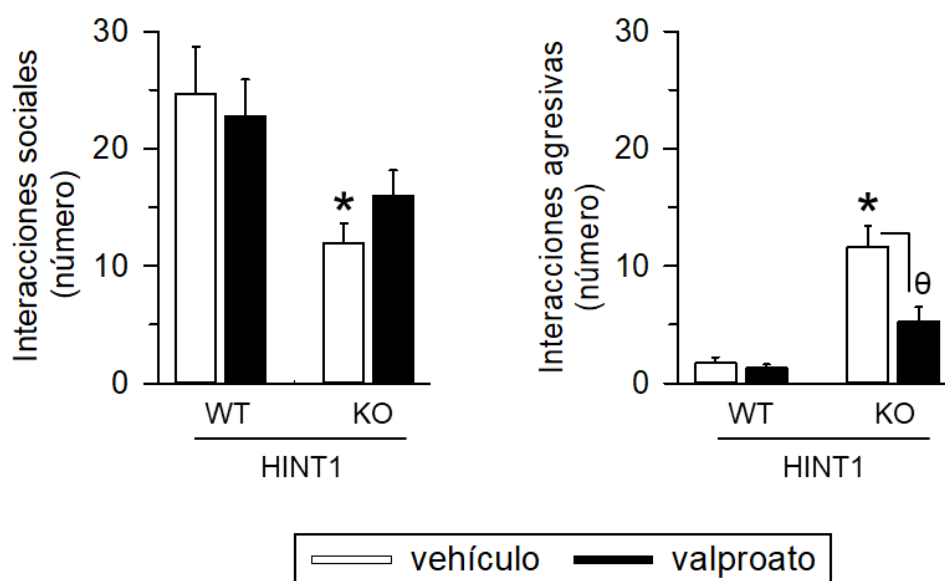


Figura 21. Interacciones residente-intruso de animales WT/KO de la HINT1. La agresividad se registró como la tasa de interacciones agresivas manifestadas por los animales con respecto al total de sus interacciones con el intruso. El valproato (200 mg/kg) se administró por vía intraperitoneal 60 minutos antes del test. Los valores corresponden a la media \pm ESM de grupos de 6 ratones de cada genotipo. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control. “ θ ” indica una diferencia significativa respecto al grupo sin valproato. ANOVA, test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; $p < 0,05$.

Otra prueba a la que fueron sometidos los ratones KO de la HINT1 para caracterizar su conducta “maniaca” fue el test de la natación forzada, que habitualmente se emplea para evaluar el efecto de fármacos antidepresivos. Sin embargo, el grupo de Einat lo empezó a utilizar recientemente para detectar comportamientos “maniacos” en los ratones BStac (Hannah-Poquette y col., 2011; Juetten y Einat, 2012). En esta prueba el ratón debe mantenerse a flote para sobrevivir, registrándose cuánto tiempo permanece el animal inmóvil, es decir, sin realizar conductas activas como nadar o luchar por salir del agua. Siguiendo este procedimiento se observó que los ratones carentes de la HINT1 eran más activos que sus controles los WT, que permanecieron inactivos casi todo el tiempo

(Figura 22). Por otro lado, ambos tipos de animales BlackSwiss exhibieron una actividad natatoria superior a los ratones WT/KO de la HINT1, pero la movilidad de los BStac fue visiblemente más elevada que la de sus controles los BScr. La administración del valproato no modificó la conducta de los dos grupos controles del estudio, pero mitigó significativamente la actividad de los ratones HINT1^{-/-} y BStac, que entonces redujeron su movilidad a niveles semejantes a los de sus respectivos controles (Figura 22).

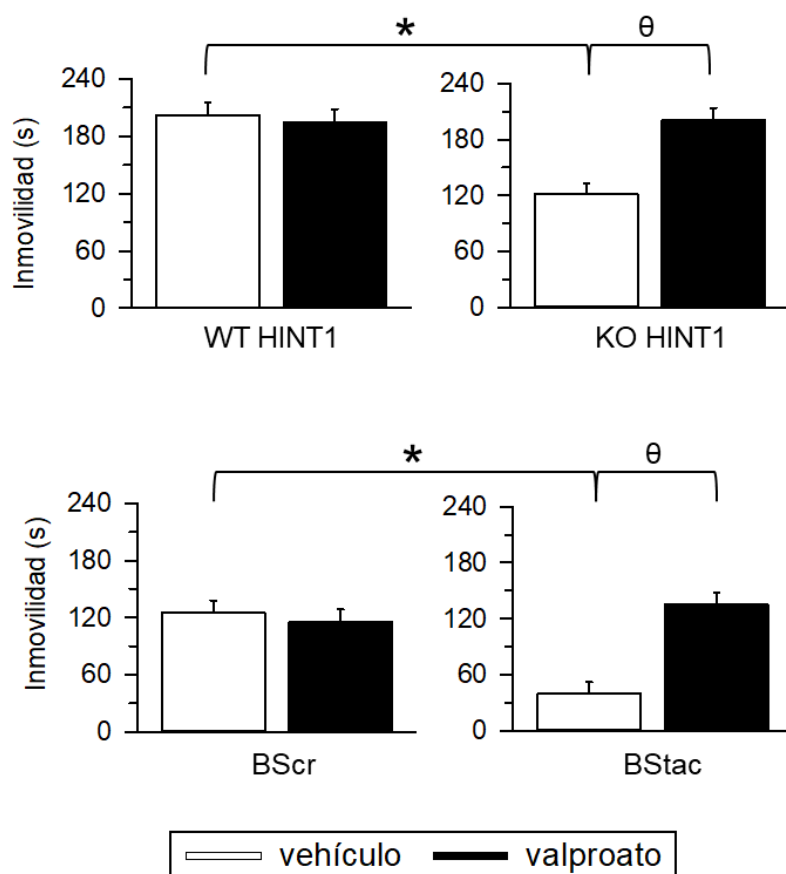


Figura 22. Test de la natación forzada aplicado a los animales WT/KO de la HINT1 y los BScr/BStac. El tiempo de inmovilidad se calculó como los segundos de los últimos 4 minutos del test durante los que los ratones no realizaron conductas “activas”. El valproato (200 mg/kg) se administró por vía intraperitoneal 60 minutos antes del test. Los valores corresponden a la media \pm ESM de grupos de 6 ratones de cada genotipo. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control. “ θ ” indica una diferencia significativa respecto al grupo sin valproato. ANOVA, test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; $p < 0,05$.

En conjunto, los resultados de las pruebas realizadas para caracterizar la posible conducta “maníaca” de los ratones deficientes en la proteína HINT1 sugieren que dichos animales manifiestan un comportamiento alterado, tipo maniaco, similar al exhibido por el modelo animal de manía, el ratón BStac.

1.2. Efecto de diferentes fármacos sobre la conducta de animales “maniacos”

De acuerdo con su perfil “maníaco”, los resultados previos de este estudio muestran que en el test de la natación forzada los ratones carentes de la HINT1 y los BStac exhibieron una mayor actividad natatoria y, por tanto, menos tiempo de inmovilidad que sus respectivos controles. Por este motivo, se procedió a estudiar en dicha prueba conductual el efecto de distintos fármacos empleados en el tratamiento de la manía humana y de la depresión (Figura 23).

En este escenario, se valoró el tiempo total de inmovilidad de los diferentes grupos de animales después de haber sido tratados con diferentes antidepresivos, como el citalopram y la amitriptilina, el estabilizador del ánimo valproato, el antagonista del receptor glutamatérgico NMDA denominado MK801, e inhibidores de las quinasas PKC y GSK3 β como el Gö7874 y el TDZD8, respectivamente. Estos fármacos se administraron una única vez por vía icv (30 minutos pre-test) o ip (60 minutos pre-test) a unas dosis ya establecidas en estudios previos. Estas dosis empleadas no afectaban a la actividad espontánea del animal.

La administración de los antidepresivos citalopram y amitriptilina aumentó los niveles de actividad de los animales control HINT1 WT y BScr, de modo que sus periodos de inactividad cayeron a niveles similares a los de los ratones “maniacos” deficientes en la HINT1 y de los BStac, respectivamente. Sin embargo, estos fármacos no produjeron cambios en la conducta de los HINT1^{-/-} ni de los BStac (Figura 23). Por tanto, estos fármacos antidepresivos activaron las conductas “pro-actividad” de los ratones control, pero dichas conductas estaban ya potenciadas en los animales KO de la HINT1 y BStac.

En este ensayo también se incluyó el antagonista del receptor ionotrópico de glutamato NMDA, el MK801, usado habitualmente para mimetizar “psicosis” en animales de experimentación. Así, la administración icv del MK801 incrementó la actividad natatoria de los controles WT de la HINT1 y BScr y también, ligeramente, la de los animales deficientes en la HINT1. Sin embargo, el MK801 no modificó el comportamiento de los animales BStac (Figura 23). Por consiguiente, el antagonismo del NMDAR indujo un comportamiento pro-actividad en animales control, que ya era muy patente en ambos grupos de animales “maniacos”: los ratones carentes de la HINT1 y los BStac.

TEST DE NATACIÓN FORZADA

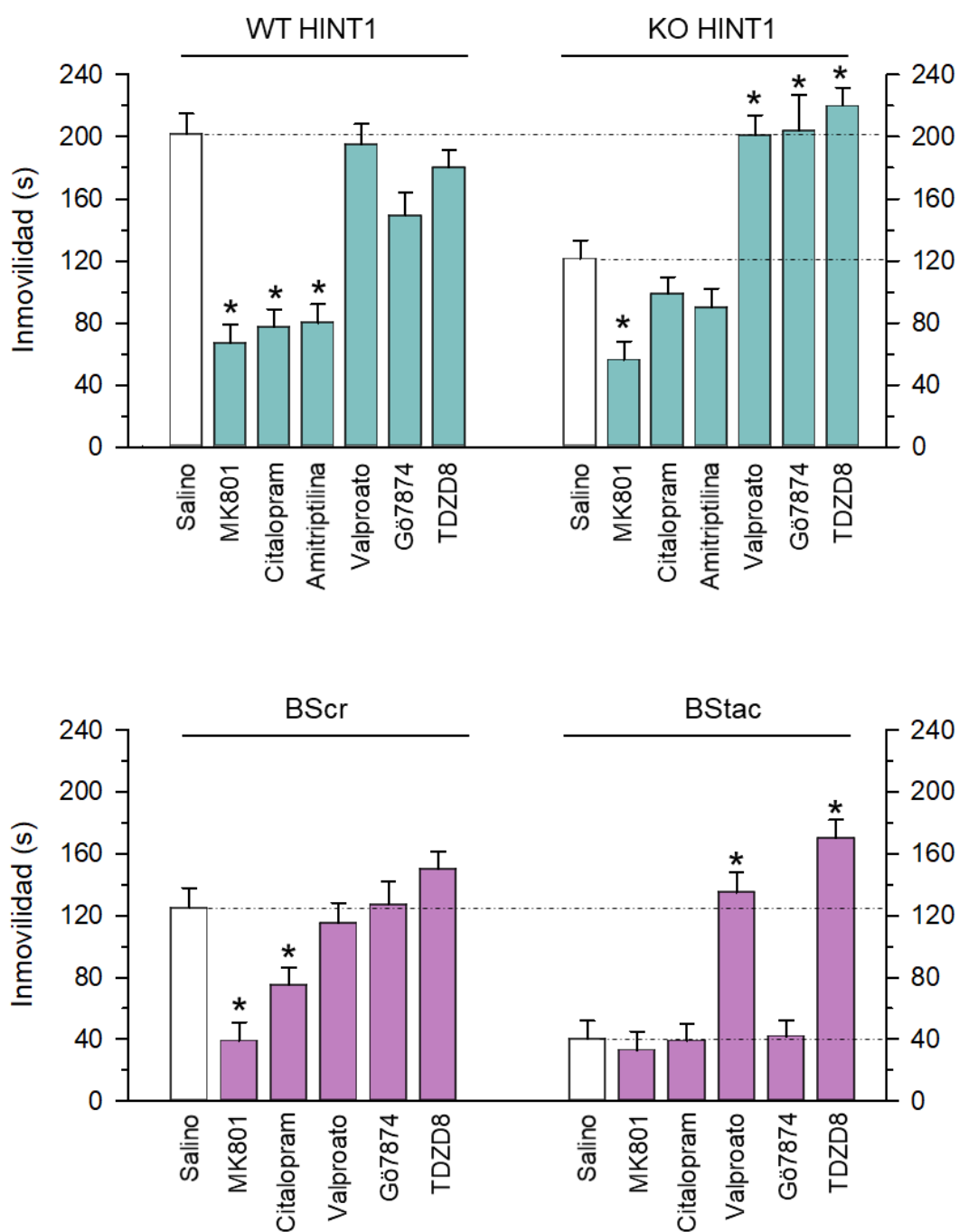


Figura 23. Efecto de antidepresivos, estabilizadores del ánimo e inhibidores de la PKC y de la GSK3 β en la actividad natatoria de ratones WT/KO de la HINT1 y de los BScr/BStac. Se valoró el tiempo total de inmovilidad de los diferentes grupos de animales durante los 4 últimos minutos del test de la natación forzada. Los fármacos se administraron por vía intraperitoneal (citalopram, 10 mg/kg; amitriptilina, 5 mg/kg; valproato, 200 mg/kg; 60 minutos antes del test) o vía icv (MK801, 1 nmol; Gö7874, 1 nmol; TDZD8, 20 nmol; 30 min antes del test). Estas dosis no afectan a la actividad espontánea del animal. Los valores corresponden a la media \pm ESM de grupos de 8 ratones de cada genotipo. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control (salino). ANOVA, test Dunnett de comparaciones múltiples *versus* grupo control; $p < 0,05$. Icv: intracerebroventricular.

Estudios previos han mostrado que la inhibición de la enzima GSK3 β , al igual que el bloqueo de la PKC, reduce la hiperactividad inducida por anfetamina en los ratones BStac (Kalinichev y Dawson, 2011; Einat, 2014). En este sentido, nuestros ensayos del test de la natación forzada con el TDZD8, un inhibidor de la quinasa GSK3 β , mostraron que este fármaco reduce la actividad de los BStac, confirmándose las conclusiones de las investigaciones precedentes. Sin embargo, la administración del inhibidor de la PKC, el Gö7874, no alteró la hiperactividad natatoria de los BStac (Figura 23). El tratamiento agudo con el Gö7874 o el TDZD8 redujo drásticamente la actividad de los ratones KO de la HINT1, que se situó en los niveles de sus animales control WT. Estos dos fármacos no alteraron de forma significativa la actividad de los animales HINT1 WT o de los BScr (Figura 23). Asimismo, con el valproato, un estabilizador de ánimo de amplio espectro ya empleado en test previos de este estudio, se obtuvieron resultados similares a los del inhibidor TDZD8 de la GSK3 β .

En resumen, estos resultados sugieren que la administración de sustancias que potencian la “conducta maniaca” o inhiben la conducta de tipo depresiva, como el bloqueante MK801, el citalopram y la amitriptilina, no afectó o lo hizo muy ligeramente a los ratones deficientes en la HINT1 y BStac, mientras que promovió la actividad de los animales control de cada una de las cepas. Por el contrario, el empleo de estabilizadores del ánimo como el valproato y la inhibición de las quinasas PKC y GSK3 β moduló la conducta de los ratones “maniacos”, reduciendo su movilidad hasta valores similares a los exhibidos por los animales control.

1.3. Los antagonistas del σ 1R modulan el comportamiento de los ratones “maniacos”

El σ 1R está implicado en diversos desórdenes neurológicos y psiquiátricos, habiéndose sugerido que los ligandos de este receptor podrían emplearse para el tratamiento de estas enfermedades (Hayashi y Su, 2004; Kourrich y col., 2012). En este sentido, el σ 1R modula la actividad del receptor de NMDA, que está implicado en esquizofrenia, depresión y trastorno bipolar (Mathews y col., 2012; Naughton y col., 2014; Poels y col., 2014; Deutschenbaur y col., 2016). Además, el tándem σ 1R-HINT1 controla la regulación cruzada que existe entre los receptores de glutamato de NMDA y ciertos GPCRs. En este contexto, el antagonismo del σ 1R previene que la HINT1 acople la función de los GPCRs con la de los NMDARs, controlando así el impacto celular de la actividad glutamatérgica (Rodríguez-Muñoz y col., 2015b). Por todo ello, se exploró el

potencial de los ligandos del σ 1R como antimaniacos/estabilizadores del ánimo en ambas cepas “maniacas” de ratones: los KO de la HINT1 y los BStac (Figura 24).

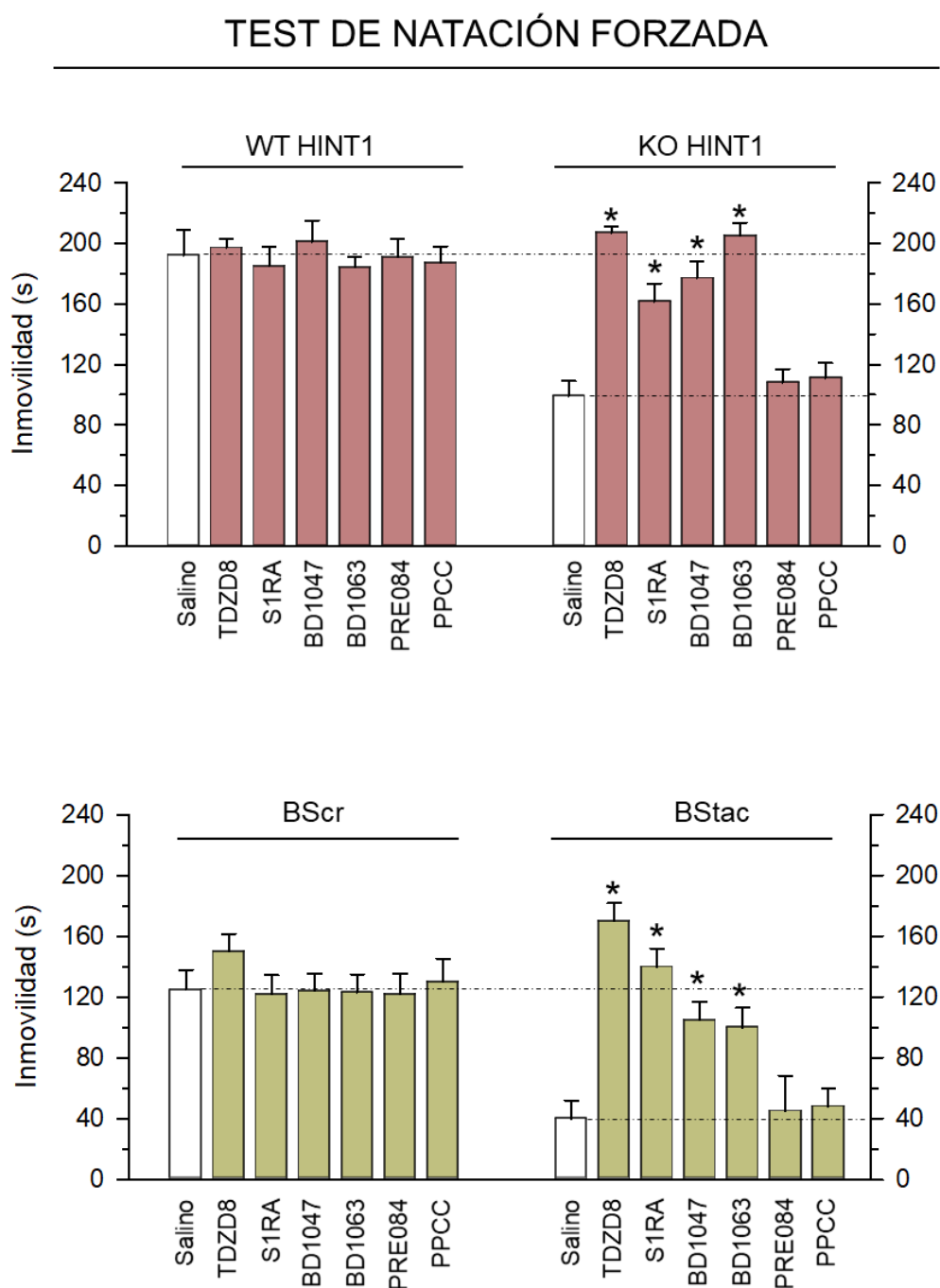


Figura 24. Efecto de ligandos del σ 1R en la actividad natatoria mostrada por ratones WT/KO de la HINT1 y los BScr/BStac. Se valoró el tiempo total de inmovilidad de los diferentes grupos de animales durante los 4 últimos minutos del test de la natación forzada. Los fármacos se administraron por vía icv (TDZD8, 20 nmol; ligandos de σ 1R, 3 nmol; 30 min antes del test). Estas dosis no afectan a la actividad espontánea del animal. Los valores corresponden a la media \pm ESM de grupos de 8 ratones de cada genotipo. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control (salino). ANOVA, test Dunnett de comparaciones múltiples *versus* grupo control; $p < 0,05$. Icv: intracerebroventricular.

Para el estudio del efecto de los ligandos del σ 1R se siguió el mismo protocolo en el test de la natación forzada que para las sustancias analizadas en el apartado anterior. Así, tras ser tratados con distintos ligandos del σ 1R, se valoró el tiempo de inmovilidad durante el ensayo de los diferentes grupos de animales. El inhibidor de la GSK3 β , el TDZD8, se llevó en paralelo con los ligandos del σ 1R como fármaco de referencia. En ambos grupos de animales control, HINT1 WT y BScr, ninguno de los compuestos empleados, ligandos del σ 1R y el TDZD8, produjo cambios significativos sobre su actividad natatoria (Figura 24). No obstante, los antagonistas del σ 1R, como el S1RA, el BD1047 y el BD1063, redujeron la movilidad de ambas cepas de ratones “maniacos” HINT1^{-/-} y BStac, hasta niveles comparables a los de sus respectivos controles. Los agonistas del σ 1R como el PRE084 y el PPCC, no alteraron la hiperactividad natatoria de los animales KO de la HINT1 o de los BStac. Por tanto, los antagonistas del σ 1R actúan como moduladores del ánimo, concretamente como fármacos antimaniacos, de manera similar a lo observado para el TDZD8.

1.4. El antagonismo del NMDAR abole la conducta “depresiva” en ratones

Los resultados del apartado 1.2. muestran que la administración del antagonista del receptor de glutamato NMDA, el MK801, potenció las conductas “pro-actividad” de las cepas de ratones del estudio. Así, el MK801 incrementó la actividad natatoria de los controles HINT1^{+/+} y BScr y también, aunque de forma moderada, la de los animales HINT1^{-/-}. Sin embargo, el MK801 no modificó el comportamiento de los animales BStac, cuya elevada actividad “maníaca” basal le dejaría poco margen de acción. El siguiente paso fue explorar si la co-administración del MK801 contrarrestaba los efectos de diferentes fármacos que “normalizan” la actividad natatoria de los ratones maniacos KO de la HINT1 y de los BStac. Se combinó el MK801 con estabilizadores del ánimo como valproato, inhibidores de la PKC y de la GSK3 β , como el Gö7874 y el TDZD8 respectivamente, y un antagonista del σ 1R, el S1RA (Figura 25). La administración del MK801 incrementó la movilidad de los ratones HINT1 WT y BScr, incluso cuando se combinó con los estabilizadores del ánimo del estudio. No obstante, en los animales HINT1^{+/+}, tanto el TDZD8 como el valproato redujeron parcialmente la hiperactividad inducida por el MK801.

TEST DE NATACIÓN FORZADA

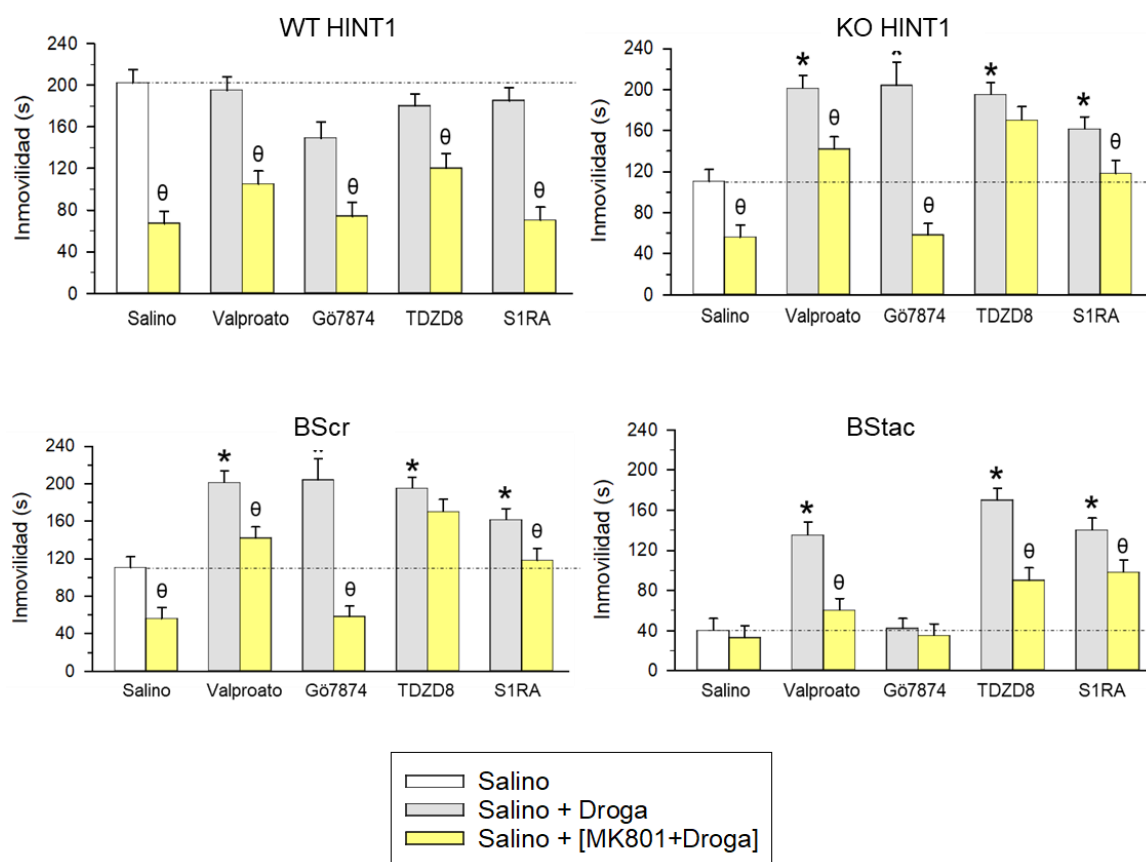


Figura 25. En el test de la natación forzada, el antagonismo del NMDAR abolió las “conductas depresivas” y enmascaró los efectos anti-maniacos promovidos por los tratamientos farmacológicos. Se valoró el tiempo total de inmovilidad de los diferentes grupos de animales durante los 4 últimos minutos del test de la natación forzada. El efecto del valproato (200 mg/kg, ip), Gö7874 (1 nmol, icv), TDZD8 (20 nmol, icv) y S1RA (3 nmol, icv) se estudió en animales WT HINT1, KO HINT1, BScr y BStac tratados con salino o MK801 (1 nmol, icv). Los compuestos se administraron 60 minutos antes del test si eran por vía ip o 30 minutos pre-test si eran por vía icv. Los valores corresponden a la media \pm ESM de grupos de 8 ratones de cada genotipo. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control (salino). “θ” indica que la actividad de los animales aumentó significativamente tras administrar MK801 sobre el tratamiento farmacológico correspondiente. ANOVA, test Dunnett de comparaciones múltiples *versus* grupo control; $p < 0,05$. Icv: intracerebroventricular; ip: intraperitoneal.

Como hemos descrito anteriormente, la elevada actividad natatoria mostrada por los animales HINT1^{-/-} se redujo por el valproato, el Gö7874, el TDZD8 y el S1RA hasta niveles similares a los de sus controles, los WT. En este escenario, el MK801 fue muy efectivo bloqueando el efecto del inhibidor de la PKC, el Gö7874, por lo que la combinación de ambos rescató la hiperactividad característica de los animales HINT1^{-/-}. Sin embargo, el antagonista del NMDAR apenas evitó los efectos “normalizadores” del valproato, del inhibidor de la GSK3 β , el TDZD8, y del antagonista del σ 1R, el S1RA

(Figura 25). Estas observaciones sugieren que las “conductas pro-depresivas” inducidas por algunos estabilizadores del ánimo requerirían de la actividad NMDAR, por lo que su inhibición por el MK801 previene o amortigua la aparición de esta conducta, manteniéndose la “manía”.

Los resultados de los BStac fueron similares a los de los KO de la HINT1 a excepción del inhibidor de la PKC, que no alteró la movilidad de estos animales “maniacos”. Sin embargo, el valproato, el TDZD8 y el S1RA redujeron la actividad de los BStac, al igual que en los ratones HINT1^{-/-}. El MK801 no potenció la actividad natatoria de estos animales “maniacos”, pero en los BStac redujo los efectos “normalizadores” del TDZD8, del valproato y del S1RA.

1.5. El estrés promueve conductas “depresivas” en ratones KO de la HINT1

En apartados previos de este estudio se ha mostrado que los ratones carentes de la HINT1 exhibían conductas “maniacas”, las cuales implicaban una mayor actividad natatoria en el test de la natación forzada que sus controles, los WT. Los animales HINT1^{+/+} no mostraron cambios comportamentales evidentes tras haber sido expuestos a una situación estresante o tras ciertas intervenciones farmacológicas. Sin embargo, los ratones KO de la HINT1 tuvieron un cambio comportamental manifiesto después de haber padecido una situación estresante, como el test de la natación forzada.

En este contexto, la hiperactividad mostrada por los ratones HINT1^{-/-} durante el ensayo del primer día no se mantuvo en su segunda exposición al test en el día siguiente. De hecho, durante el segundo día del test la movilidad de los ratones KO de la HINT1 era menor respecto a la del primer día, con niveles similares a los de sus controles, los WT (Figura 26). Por el contrario, la otra cepa de ratones “maniacos”, los BStac, presentaron una conducta hiperactiva durante los dos días del test de la natación forzada. Por tanto, los animales KO de la HINT1 desarrollaron “conductas depresivas” en respuesta a estrés, mientras que esta circunstancia no alteró el comportamiento de los BStac. Estas observaciones nos han llevado a proponer a los ratones HINT1^{-/-} como modelo animal del trastorno bipolar humano: de forma basal estos animales manifestaron conductas “maniacas” y, tras ser expuestos a situaciones estresantes, este comportamiento viró a un estado “depresivo”.

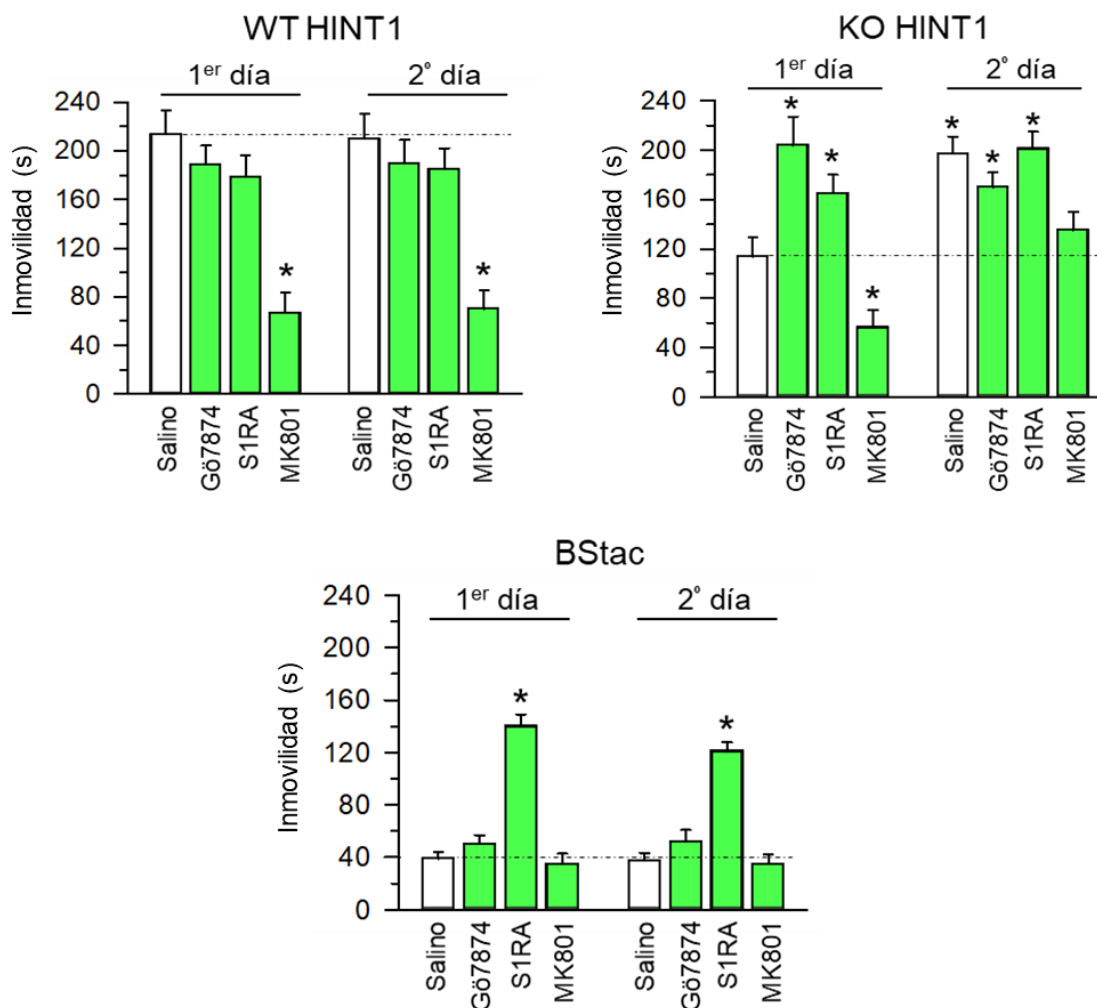


Figura 26. Cambios comportamentales inducidos por el estrés en los ratones WT/KO de la HINT1 y en los BStac. Se valoró el tiempo total de inmovilidad de los diferentes grupos de animales durante los 4 últimos minutos del test de la natación forzada, que se realizó en dos días consecutivos. Los fármacos se administraron por vía icv (Gö7874, 1 nmol; S1RA, 3 nmol; MK801, 1 nmol; 30 min antes del test durante los dos días). Estas dosis no afectan a la actividad espontánea del animal. Los valores corresponden a la media \pm ESM de grupos de 8 ratones de cada genotipo. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control (salino) del primer día de test. ANOVA, test Dunnett de comparaciones múltiples *versus* grupo control; $p < 0,05$. Icv: intracerebroventricular.

Como ya hemos visto, el bloqueo de la PKC por el Gö7874, o el antagonismo del σ 1R por el S1RA redujeron significativamente la actividad natatoria de los animales KO de la HINT1 en el primer día del test de la natación forzada. Es significativo que el efecto de estos fármacos cambiase al administrarse en el segundo día del ensayo, cuando los ratones HINT1^{-/-} presentaban un “episodio depresivo” inducido por el estrés. Así, el S1RA no modificó los niveles de movilidad de los HINT1^{-/-}, ya reducidos en el segundo día de ensayo; sin embargo, el Gö7874 aumentó ligeramente su actividad en el test.

Por otro lado, el antagonista del NMDAR, el MK801, potenció ligeramente la movilidad de los KO de la HINT1 el primer día del test de la natación forzada. En el segundo día de ensayo, cuando los animales HINT1^{-/-} habían desarrollado una “conducta depresiva”, el MK801 promovió la actividad de estos ratones hasta los niveles espontáneos del primer día (Figura 9).

En cuanto a los controles WT de la HINT1, su actividad fue similar durante los dos días consecutivos del test y los compuestos Gö7874 y S1RA no alteraron su conducta. No obstante, el MK801 potenció su movilidad de forma parecida durante los dos días del ensayo. Los ratones “maniacos” BStac mantuvieron una conducta hiperactiva durante los dos días del test, por lo que el estrés no pareció afectarles. Ni la administración del inhibidor de la PKC, el Gö7874, ni la del MK801, modificaron la movilidad de los BStac, mientras que el antagonista del σ 1R, el S1RA, la redujo significativamente (Figura 26).

En base a estos resultados, se podría concluir que la actividad del NMDAR estaría implicada en los episodios depresivos inducidos por estrés en los ratones KO de la HINT1. Así, la inhibición del NMDAR por el antagonista MK801 redujo la manifestación de estos comportamientos, recuperándose el fenotipo “maniacos”. Por el contrario, parece que los procesos dependientes del NMDAR (procesos pro-depresivos) no prevalecen sobre los mecanismos causantes de una “conducta maniaca” en los animales BStac.

1.6. Alteraciones moleculares observadas en ratones HINT1^{-/-} y BStac

Tras llevar a cabo la evaluación fenotípica de las dos cepas murinas “maniacas” del estudio, se exploraron los posibles cambios moleculares subyacentes a estas conductas. En primer lugar, y debido a su alteración en múltiples trastornos del ánimo (Jope y Roh, 2006), se analizó la presencia de la quinasa GSK3 β y sus fosforilaciones reguladoras. Estudios previos han descrito dos lugares principales de fosforilación en la secuencia de la GSK3 β : la serina 9 (P-S9) y la tirosina 216 (P-Y216), que regulan la inhibición y potenciación de su actividad enzimática, respectivamente (Hughes y col., 1993; Bhat y col., 2000).

La exploración molecular mostró que los niveles totales de la GSK3 β en las membranas sinaptosomales de corteza frontal no varían de forma significativa entre los ratones KO de la HINT1, los BStac, y sus respectivos controles (Figura 27). Sin embargo, entre estos animales se encontraron marcadas diferencias en las fosforilaciones

reguladoras de la actividad GSK3 β . Así, la fosforilación inhibitoria de la GSK3 β en la S9, producida por la acción de la Akt, era considerablemente menor en ambos tipos de ratones “maniacos” con respecto a sus controles. Sin embargo, los niveles de fosforilación activadora P-Y216 eran bajos en los animales HINT1^{-/-} con respecto a los de sus controles los WT, mientras que los ratones BStac presentaban unos niveles muy elevados de esta fosforilación (Figura 27).

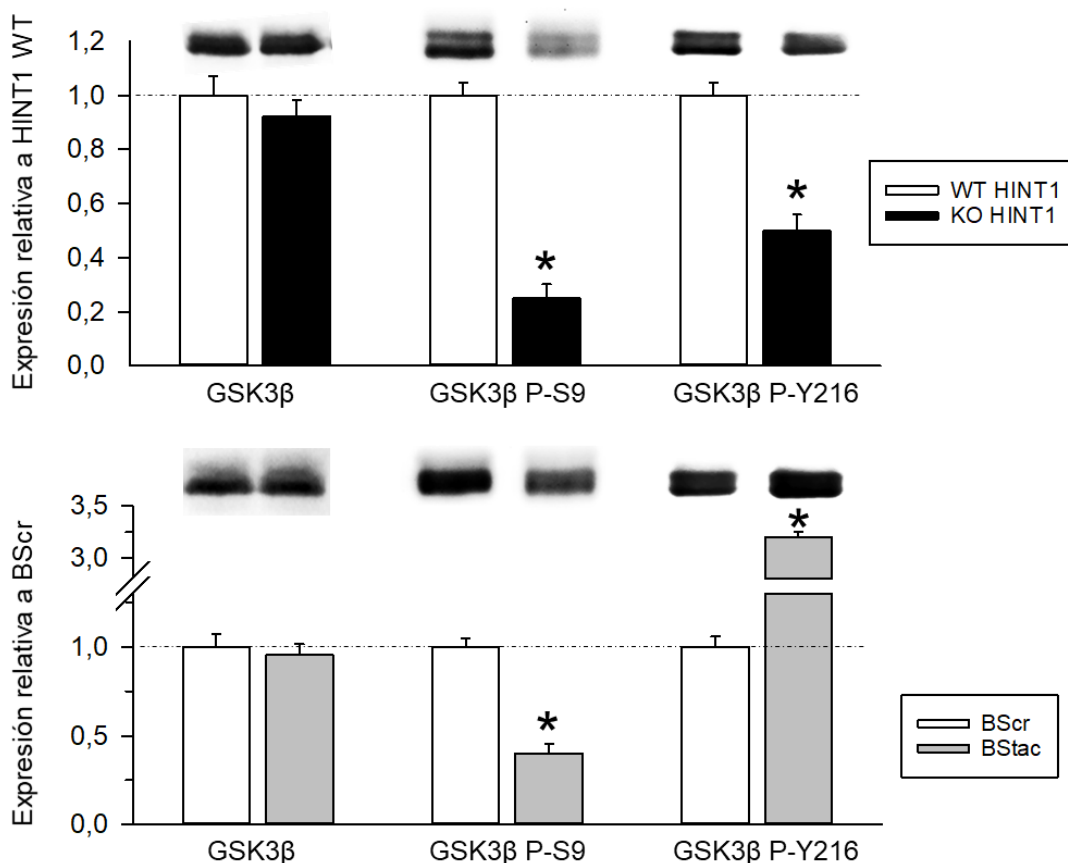


Figura 27. Niveles totales y de fosforilación de la GSK3 β en ratones WT/KO de la HINT1 y en los BScr/BStac. Los niveles totales y de fosforilación de serina 9 (P-S9) y tirosina 216 (P-Y216) de la GSK3 β en membranas sinaptosomales de corteza frontal se determinaron por SDS-PAGE y posterior *western-blot*. A la inmunoseñal correspondiente a WT HINT1 y BScr (los dos grupos control empleados) se le asignó el valor arbitrario de 1. El experimento fue repetido 3 veces con muestras procedentes de diferentes cohortes de ratones que no habían sido sometidos previamente a ningún test de comportamiento. Los valores corresponden a la media \pm ESM de grupos de 8 ratones de cada genotipo. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control (WT HINT1 o BScr). ANOVA, test Dunnett de comparaciones múltiples *versus* grupo control; $p < 0,05$.

En consonancia con estos resultados, la conducta maniaca habitualmente se relaciona con una actividad elevada de la GSK3 β , por lo que su inhibición farmacológica permite un control rápido de este comportamiento (Polter y col., 2010). Por tanto, aunque los

animales KO de la HINT1 y los BStac exhiben “conductas maniacas”, existen diferencias entre sus niveles corticales de fosforilación en la GSK3 β . No obstante, en ambos grupos los niveles de fosforilación activadora de P-Y216 predominan sobre los niveles de P-S9, lo que conllevaría una mayor actividad de la GSK3 β que en los ratones control.

Asimismo, se evaluaron los niveles de las subunidades del NMDAR en la corteza frontal de los ratones “maniacos” (Figura 28). Se pudo observar que los niveles de la subunidad NR1 eran comparables en los diferentes grupos de animales estudiados, sin embargo, la subpoblación de NR1 que contiene el segmento citosólico C1 duplicaba a la que carece de ella en los ratones KO de la HINT1. Además, los niveles de la subunidad NR2A eran comparables entre WT y KO de la HINT1, mientras que la subunidad NR2B era más abundante en los animales HINT1^{-/-}. Respecto a los ratones BStac, los niveles de las subunidades del NMDAR eran similares a los de sus controles BScr. Por tanto, los animales KO de la HINT1 presentaban un elevado número de subunidades NR1 C1, lo que implicaría una mayor conexión con ciertos receptores G, y una mayor ratio NR2B/NR2A que sus congéneres WT, lo que sugiere que la transición de LTP a LTD y viceversa estaría alterada.

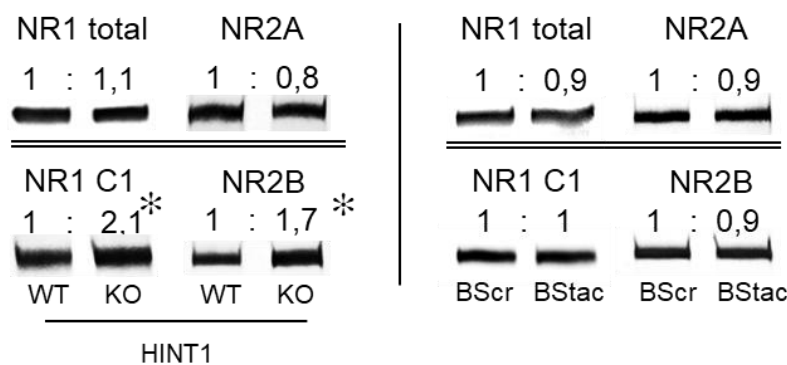


Figura 28. Niveles de subunidades del NMDAR en ratones WT/KO de HINT1 y en los BScr/BStac. Los niveles totales de subunidades del NMDAR en membranas sinaptosomales de corteza frontal se determinaron por SDS-PAGE y posterior *western-blot*. A la inmunoseñal correspondiente a WT HINT1 y BScr (los dos grupos control empleados) se le asignó el valor arbitrario de 1. El experimento fue repetido 3 veces con muestras procedentes de diferentes cohortes de ratones que no habían sido sometidos previamente a ningún test de comportamiento. Los valores corresponden a la media \pm ESM de grupos de 8 ratones de cada genotipo. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control (WT HINT1 o BScr). ANOVA, test Dunnett de comparaciones múltiples *versus* grupo control; $p < 0,05$.

En resumen, los ratones deficientes en la proteína HINT1 compartirían una serie de cambios moleculares con los pacientes bipolares, tales como alteraciones en la enzima

GSK3 β y el receptor de glutamato NMDA. Esto podría causar una serie de alteraciones en la función de las sinapsis corticales, las cuales son esenciales para el aprendizaje y la consolidación de la memoria.

1.7. Efecto de la inhibición de la PKC sobre la enzima GSK3 β en ratones HINT1^{-/-}

Después de haber explorado los niveles basales de la quinasa GSK3 β y sus fosforilaciones reguladoras, se analizó el efecto de la administración del inhibidor de PKC, el Gö7874, sobre las características de la GSK3 β en los ratones KO de la HINT1 y sus controles WT. Como se ha mostrado en apartados anteriores, la inhibición de la PKC abolió la conducta “maniaca” en los ratones deficientes de la HINT1 mientras que no alteró el comportamiento de los ratones control (ver Figura 23, apartado 1.2. de Resultados).

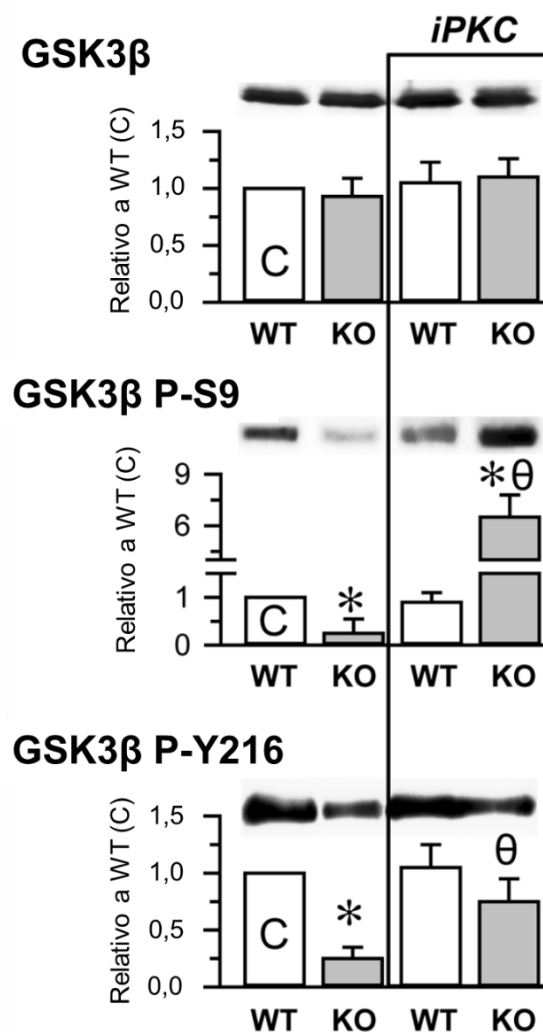


Figura 29. Efectos de la inhibición de la PKC sobre la GSK3 β y sus fosforilaciones reguladoras en ratones WT/KO de la HINT1. Los niveles totales y de fosforilación de serina 9 (P-S9) y tirosina 216 (P-Y216) de la GSK3 β en membranas sinaptosomales de corteza frontal se determinaron por SDS-PAGE y posterior *western-blot*. El inhibidor de la PKC (iPKC), el Gö7874, se administró a una dosis de 1 nmol por vía icv 30 min antes del test. A la inmunoseñal correspondiente a WT HINT1 sin tratamiento (grupo control) se le asignó el valor arbitrario de 1. El experimento fue repetido 3 veces con muestras procedentes de diferentes cohortes de ratones que no habían sido sometidos previamente a ningún test de comportamiento. Los valores corresponden a la media \pm ESM de grupos de 8 ratones de cada genotipo. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control (WT HINT1 sin tratamiento). “ θ ” cambio significativo en los KO de HINT1 tras administrar iPKC con respecto a HINT1^{-/-} sin tratamiento. ANOVA, test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; $p < 0,05$.

A nivel molecular, esta droga no modificó los niveles totales de la quinasa GSK3 β ni de sus fosforilaciones en los animales control WT, pero sí incrementó en los ratones HINT1^{-/-}, y muy significativamente, unas 22 veces, los niveles de fosforilación en la serina 9. La inhibición de la PKC provocó un aumento, aunque moderado, de los niveles de fosforilación activadora P-Y216 en los ratones KO de la HINT1 (Figura 29).

En conjunto, la inhibición de la PKC conllevaría una reducción de la actividad quinasa de la GSK3 β , que se traduciría en una supresión de la conducta “pro-actividad” de los ratones deficientes de la HINT1.

La caracterización fenotípica de los ratones KO de la HINT1 nos permitió determinar el comportamiento “bipolar” de estos ratones, así como el efecto de diferentes sustancias en esta conducta. Con todos estos resultados, proponemos que los ratones HINT1^{-/-} podrían emplearse como modelo animal del trastorno bipolar humano, permitiendo estudiar el efecto de nuevos fármacos dirigidos a paliar esta patología.

2. Actividad SUMO proteasa de la HINT1

2.1. Unión de la HINT1 al SUMO1 y la CaM

En humanos, la familia HINT incluye 3 miembros: HINT1 con 126 aminoácidos, HINT2 con 163 y HINT3 con 165 (Figura 30A). Estas proteínas contienen el motivo HIT cerca de su extremo carboxilo terminal, formado por una tríada de histidinas que se alternan con aminoácidos hidrofóbicos en la secuencia **HI(L)HL(I)HVL(I)**. De este modo, en esta región también se podría configurar un motivo típico de interacción con la proteína *small ubiquitin-like modifier* (SUMO), denominado *sumo-interacting motif* (SIM) (Zhao y col., 2014).

Mediante ensayos de interacción *in vitro* se analizó la unión de las proteínas HINT con SUMO. La proteína HINT correspondiente (200 nM) y el SUMO1/2 acoplado covalentemente a agarosa (100 nM) se co-incubaron durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Tras eliminar la HINT no unida al SUMO1/2, la HINT acoplada se separó por solubilización con el tampón *Laemmli* 2X calentado a 100 °C y posterior filtración. La HINT procedente de su unión al SUMO1/2 se resolvió mediante SDS-

PAGE, detectándose por *western-blot*. Como se muestra en la Figura 30B, se observó que la HINT1, al contrario que HINT2 y HINT3, se une a las proteínas SUMO1 y SUMO2.

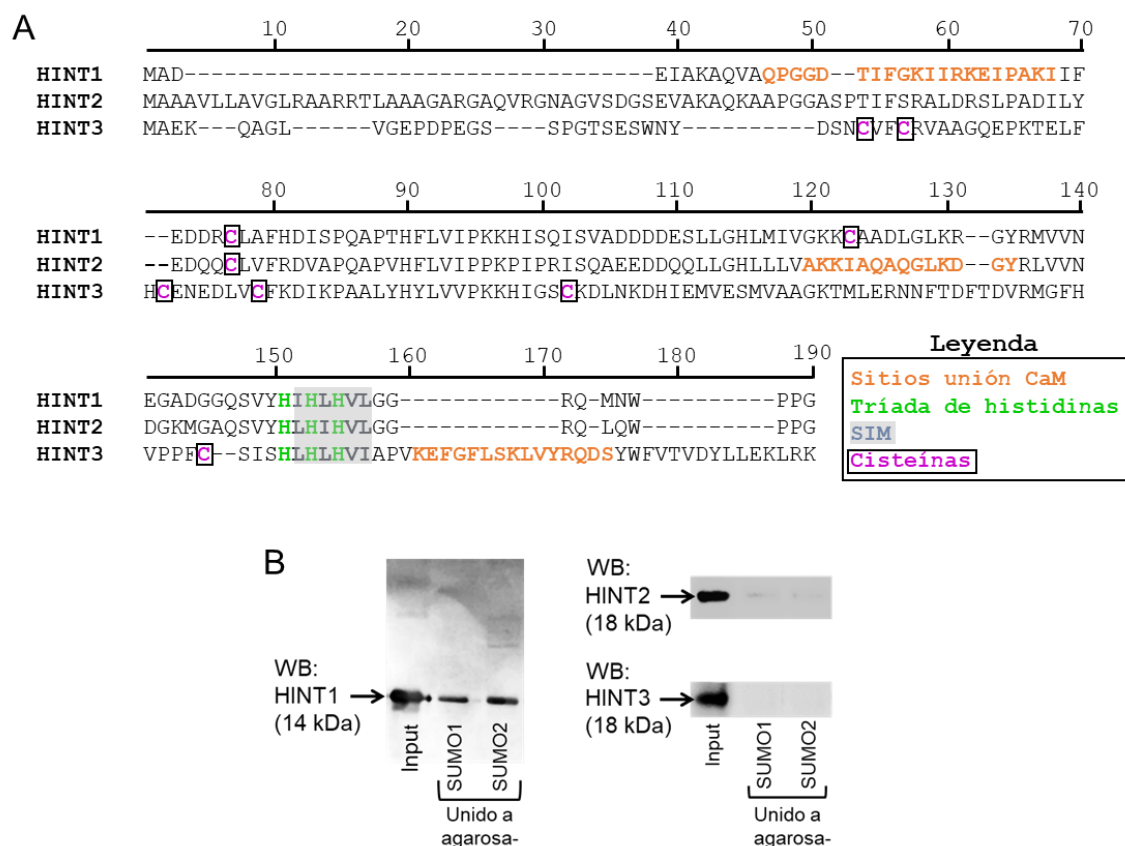


Figura 30. Alineamiento de las proteínas HINT y su unión a SUMO. (A) Alineamiento de las secuencias de los 3 miembros de la familia HINT en humanos (*MegAlign: DNASTAR*). En todas las proteínas HINT se predice un motivo de unión a CaM, pero con distinta secuencia de aminoácidos. Se indica la tríada de histidinas del motivo HIT, que se alternan con aminoácidos hidrofóbicos que en HINT1 da lugar a un SIM. Se recuadran las cisteínas que contiene la secuencia completa de cada proteína HINT. (B) Unión de HINT (200 nM) a agarosa-SUMO (100 nM). HINT1, pero no HINT2 ni HINT3, se asocia con las proteínas SUMO1 y 2. WB: *western-blot*.

A continuación, se procedió a determinar si el motivo SIM de la HINT1 residía en la secuencia candidata (110-116 HIHLHVL). Con este propósito, se clonaron una serie de mutaciones puntuales de la HINT1 (H112N, H114R, V115D y L116Q), realizándose ensayos de interacción entre las HINT1 mutadas (200 nM) y agarosa-SUMO2 (100 nM). Se observó que las mutaciones puntuales V115D y L116Q, y en menor medida H112N y H114R, reducen significativamente la asociación de la HINT1 con agarosa-SUMO2 (Figura 31).

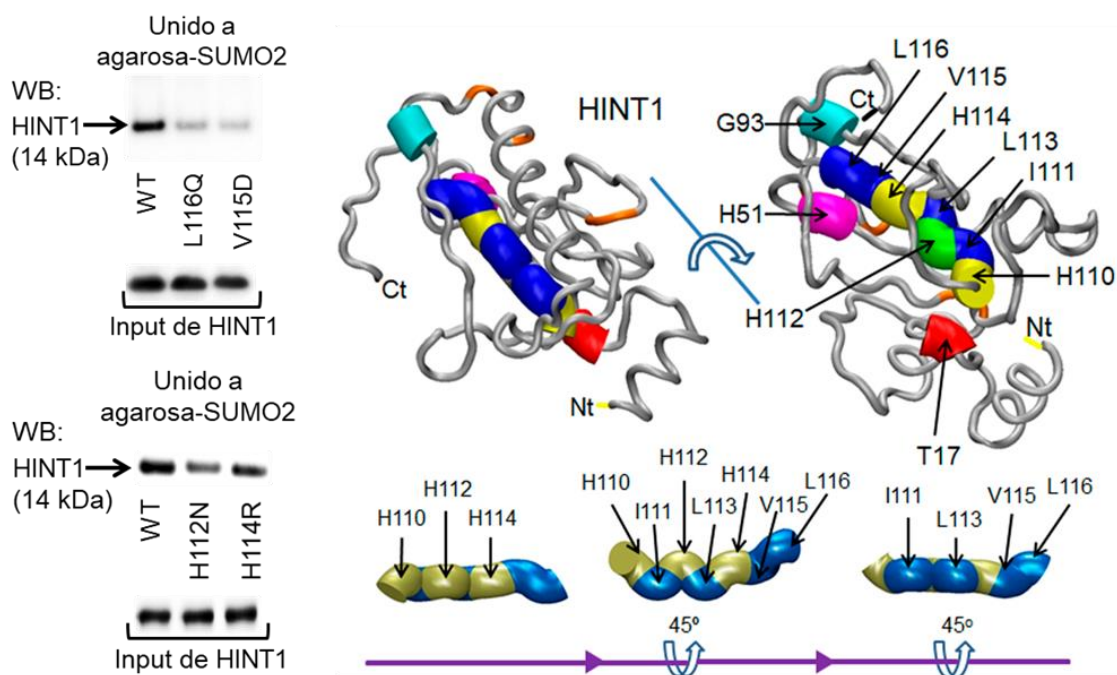


Figura 31. La secuencia 110-116 de la HINT1 contiene los motivos HIT y SIM, que forman superficies opuestas. La unión de los mutantes del SIM de la HINT1 (200 nM) al SUMO2 (100 nM) es débil. Se muestra la estructura tridimensional de la HINT1 como un tubo gris en el que se destacan los aminoácidos de interés como cilindros coloreados. La proteína HINT1 y la secuencia 110-116 que incluye los motivos HIT y SIM se han rotado para mostrar su organización tridimensional. Los modelos estructurales de la HINT1 se han diseñado con el programa *Novafold (DNASTAR)*. WB: *western-blot*.

Por otra parte, el análisis de la secuencia proteica (Yap y col., 2000) predijo que todos los miembros de la familia HINT contienen un motivo de unión a la CaM, aunque localizado en secuencias aminoacídicas diferentes. Mientras que la HINT1 tiene el sitio de unión a CaM en su extremo amino terminal, en la HINT2 se localiza en una región interna y en el extremo carboxilo terminal en la HINT3 (Figura 30A).

Para analizar la unión de los miembros de la familia HINT a la CaM, se realizaron ensayos de interacción *in vitro* similares a los previamente descritos para el SUMO. De este modo, los resultados mostraron que tanto la HINT1 como la HINT3 son capaces de asociarse con agarosa-CaM y, además, los niveles fisiológicos de calcio (2,5 mM) refuerzan la unión HINT1-CaM (Figura 32). En consonancia, la mutación T17A de la HINT1, localizada dentro del motivo de unión de la HINT1 a la CaM (12-31 QPGGDTIFGKIIRKEIPAKI), abolió la formación del complejo HINT1-CaM (Figura 3B).

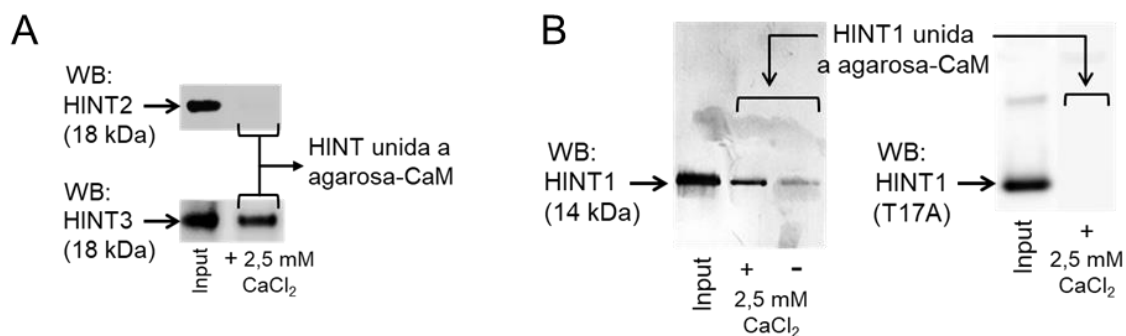


Figura 32. Unión de las HINT a la CaM. (A) Unión de la HINT2/3 (200 nM) a agarosa-CaM (100 nM). La HINT3, pero no la HINT2 se unió a la CaM. (B) El *blot* de la izquierda corresponde a la unión de la HINT1 WT (200 nM) a agarosa-CaM (100 nM) en presencia o ausencia de CaCl₂ (2,5 mM). La unión se reforzaba cuando había calcio en el medio. El *blot* de la derecha muestra que la mutación T17A, localizada en el dominio de unión a la CaM, impidió la asociación HINT1-CaM. WB: *western-blot*.

2.2. La HINT1 posee actividad SUMO proteasa

Previo al estudio de la posible actividad enzimática de la HINT1, se analizó su capacidad de interactuar *in vitro* con varias proteínas susceptibles de ser sus sustratos sumoilados: GST-RanGAP1, GST-RGSZ2 e ICD de la teneurina 1 (Figura 33).

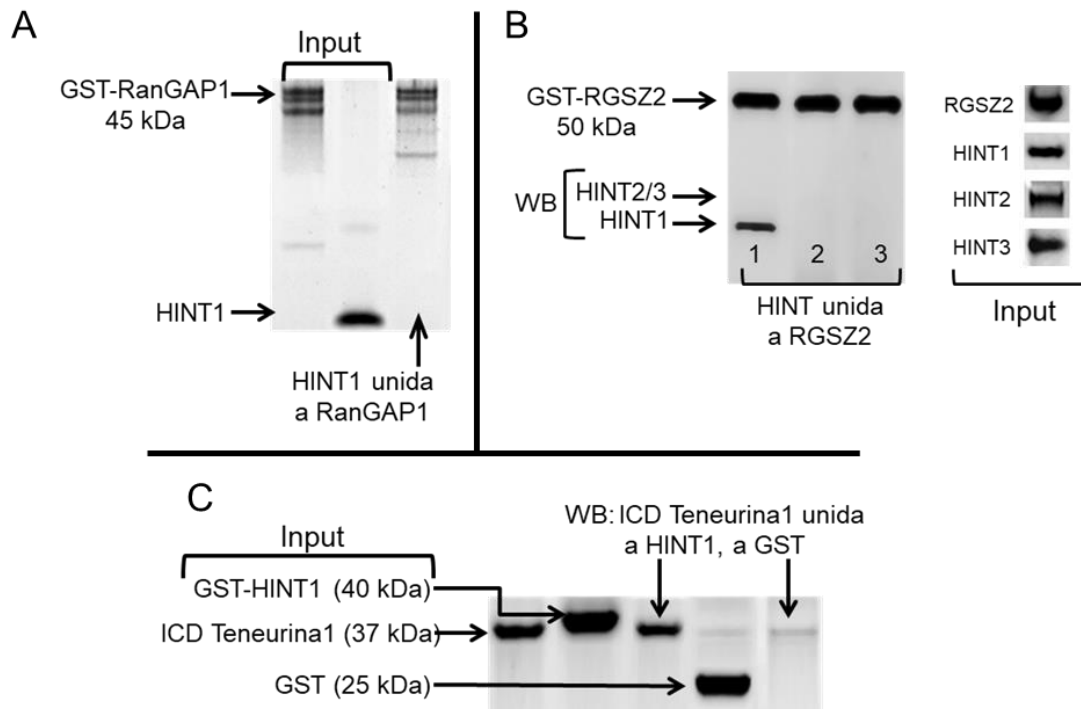


Figura 33. Unión de la HINT1 con las proteínas utilizadas como sustratos de sumoilación. (A) La HINT1 no se unió a la RanGAP1. (B) La GST-RGSZ2 se asoció con la HINT1, pero no con la HINT2 ni la HINT3. La imagen de la derecha muestra las cantidades de las proteínas empleadas en el ensayo *in vitro*. (C) El ICD de la teneurina 1 se unió a la GST-HINT1, pero no al *tag* de GST. HINT1/2/3 e ICD de teneurina 1 (200 nM); GST-RanGAP1, GST-RGSZ2, GST-HINT1 y GST (100 nM). WB: *western-blot*.

Los posibles sustratos se co-incubaron con la HINT1/2/3 para posteriormente capturar los complejos proteicos con glutatión agarosa. Las asociaciones se resolvieron en SDS-PAGE y se detectaron las proteínas por *western-blot*. Se confirmó la formación de complejos HINT1-RGSZ2 (Rodríguez-Muñoz y col., 2011), y se comprobó que la HINT2 y la HINT3 no se asocian con la RGSZ2 (Figura 33B). La HINT1 también interactuó con el ICD de la teneurina 1 (Figura 33C), como previamente se había descrito en cultivos celulares (Schöler y col., 2015). Por el contrario, la HINT1 no se unió a la RanGAP1, empleada habitualmente como sustrato control en los ensayos *in vitro* de sumoilación (Figura 33A).

Inicialmente, se estudió la actividad isopeptidasa de la HINT1 empleando como sustrato la RanGAP1 sumoilada. Se siguieron las indicaciones del *kit* de sumoilación comercial de *Enzo* (*BML-UW8955*). Cada ensayo de sumoilación se realizó en un volumen final de 20 μ L que se incubó 1 hora a 37 $^{\circ}$ C, obteniéndose la RanGAP1 sumoilada. El proceso de desumoilación comenzó al añadir la HINT1 (2 μ M) junto con la CaM (6 μ M), activada por CaCl₂ (2,5 mM), sobre la muestra en la que se había realizado la sumoilación. La reacción se llevó a cabo durante 1 hora a 37 $^{\circ}$ C tras la que se paró el proceso con el tampón *Laemmli* 2X para su análisis posterior por SDS-PAGE.

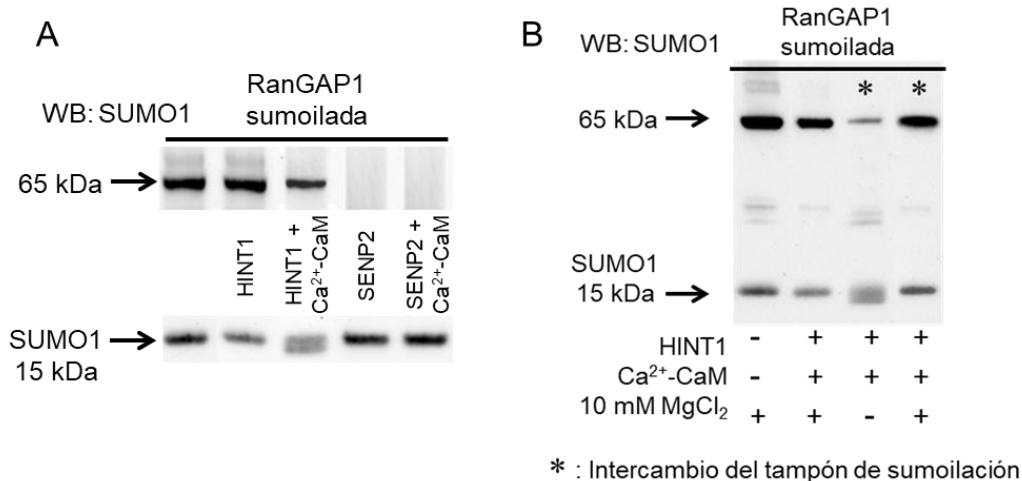


Figura 34. La HINT1 manifestó actividad SUMO proteasa. (A) La HINT1, pero no la SENP2, necesitó la presencia de Ca²⁺-CaM para su actividad isopeptidasa sobre la RanGAP1 sumoilada. (B) La eliminación del magnesio (MgCl₂) presente en el tampón de sumoilación mejoró la actividad sumoilasa de la HINT1. La primera calle corresponde a los niveles de la RanGAP1 sumoilada en ausencia de la HINT1. La segunda calle muestra la actividad de la HINT1 promovida por Ca²⁺-CaM sobre la RanGAP1 en el tampón de sumoilación. En la tercera calle se expone la capacidad SUMO proteasa de la HINT1 tras intercambiar el tampón de sumoilación por un tampón con una menor concentración de MgCl₂ (0,3 mM). La cuarta calle corresponde a la actividad de la HINT1 sobre la RanGAP1 tras intercambiar el tampón de sumoilación, pero añadiendo posteriormente 10 mM de MgCl₂. HINT1 (2 μ M), CaCl₂ (2,5 mM), CaM (6 μ M), SENP2 (0,3 μ M), RanGAP1 sumoilada (1 μ M). WB: *western-blot*.

En los ensayos de desumoilación se empleó la proteasa específica de sentrina 2 (SENP2) (0,3 μM) como control de actividad SUMO proteasa, debido a que su actividad isopeptidasa está ampliamente caracterizada (Mikolajczyk y col., 2007; Mukhopadhyay y Dasso, 2007; Xu y col., 2009). En estas condiciones, se observó que la SENP2 eliminó eficazmente el SUMO1 de la RanGAP1 sumoilada independientemente de Ca^{2+} -CaM. Sin embargo, la HINT1 sólo fue capaz de quitarlo parcialmente, con ligeras variaciones en su actividad en función de la ausencia o presencia de la Ca^{2+} -CaM (Figura 34A).

La escasa actividad SUMO proteasa de la HINT1 nos llevó a pensar que los 10 mM de MgCl_2 que contenía el tampón de sumoilación podrían interferir con la activación por calcio de la CaM (Grabarek, 2011). Por ello, analizamos la actividad de la HINT1 en ausencia de magnesio. Así, después del ensayo de sumoilación, se intercambiò el tampón mediante dilución y concentración por uno nuevo cuya concentración de MgCl_2 se había reducido a 0,3 mM. En estas nuevas condiciones, se añadió la HINT1 (2 μM) junto con Ca^{2+} -CaM (6 μM) observándose que entonces la HINT1 sí eliminó eficazmente el SUMO1 de la RanGAP1. Confirmando lo esperado, la adición *de novo* de 10 mM de MgCl_2 suprimió de nuevo la actividad isopeptidasa de la HINT1 (Figura 34B).

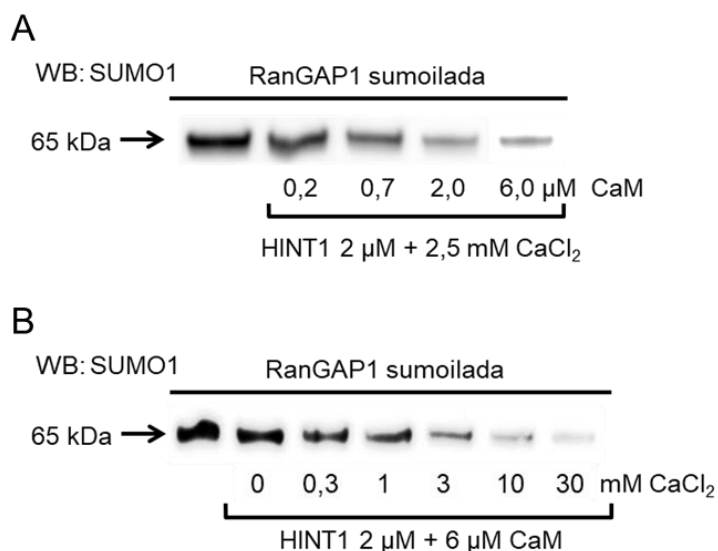


Figura 35. La actividad de la HINT1 aumentaba en presencia de concentraciones crecientes de CaM y CaCl_2 . (A y B) En ambos paneles, la primera calle corresponde a los niveles de sumoilación de la RanGAP1, y las calles posteriores muestran la creciente actividad de la HINT1 con concentraciones crecientes de CaM (A) o CaCl_2 (B). HINT1 (2 μM), RanGAP1 sumoilada (1 μM). WB: *western-blot*.

Se caracterizó la regulación de la actividad isopeptidasa de la HINT1 mediante concentraciones crecientes de CaM o de CaCl_2 . Observamos que la función SUMO proteasa de 2 μM de HINT1 es máxima en presencia de 6 μM de CaM y aproximadamente 10 mM de CaCl_2 (Figura 35A y B). Por tanto, en todos los ensayos realizados posteriormente, la actividad SUMO proteasa de la HINT1 se analizó

manteniendo los parámetros mencionados anteriormente: intercambio del tampón de sumoilación, 6 μM de CaM y 2,5 mM de CaCl_2 (niveles fisiológicos).

Una vez establecidas las condiciones óptimas de desumoilación, se exploró la posible actividad de los otros miembros de la familia HINT. Al contrario que la HINT1, la HINT2 y la HINT3 no presentaron actividad isopeptidasa dependiente de Ca^{2+} -CaM (Figura 36A). Además, la HINT1 y el GST no son sustratos de sumoilación, ya que no incorporaron SUMO1 (Figura 36B).

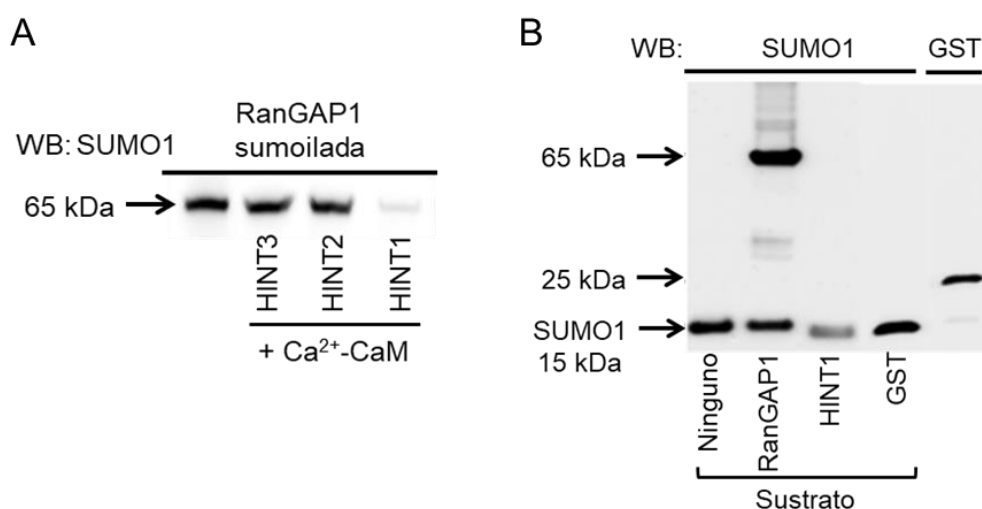


Figura 36. (A) La HINT1, pero no la HINT2 ni la HINT3, manifestó actividad SUMO proteasa dependiente de la Ca^{2+} -CaM sobre la RanGAP1. HINT1/2/3 (2 μM), CaCl_2 (2,5 mM), CaM (6 μM), RanGAP1 sumoilada (1 μM). (B) En los ensayos de sumoilación, ni la HINT1 ni el GST incorporaron SUMO1, llevando como control a la RanGAP1, que sí se sumoiló. La última calle muestra la cantidad inicial del GST empleada como sustrato. RanGAP1, HINT1 y GST (1 μM). WB: *western-blot*.

2.3. Actividad SUMO proteasa de la HINT1 sobre diferentes sustratos

El estudio de la actividad isopeptidasa exhibida por la HINT1 sobre la RanGAP1 se extendió a otras proteínas de señalización con las que HINT1 interactúa, tal y como hemos descrito en el apartado anterior: RGSZ2 y el ICD de la teneurina 1. La presencia de la RGSZ2 sumoilada con SUMO1/2/3 se ha detectado en membranas sinaptosomales de PAG (Rodríguez-Muñoz y col., 2007a). En nuestros ensayos *in vitro*, la sumoilación de la RGSZ2 recombinante con el SUMO1 generó una banda principal de aproximadamente 40 kDa. Optimizamos la reacción de sumoilación empleando cantidades decrecientes de la RGSZ2, por un lado, y del SUMO1 por el otro. Así, establecimos usar 1 μM de la RGSZ2 y 0,3 μM del SUMO1 para los ensayos de sumoilación (Figura 37).

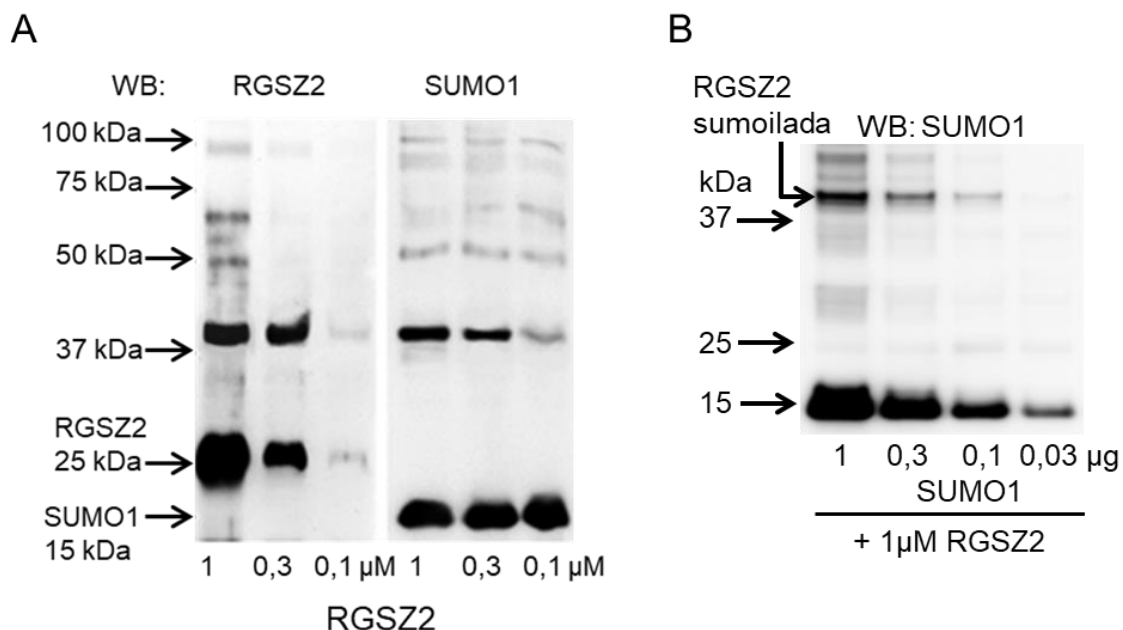


Figura 37. La RGSZ2 incorporaba SUMO1. (A) Se optimiza la reacción de sumoilación con cantidades decrecientes (1-0,3-0,1 μM) de la RGSZ2, detectándose con un anticuerpo dirigido contra la RGSZ2 o contra el SUMO1. (B) Se analiza la eficacia de la reacción de sumoilación de la RGSZ2 con cantidades decrecientes del SUMO1 (1-0,3-0,1-0,03 μg), mientras se mantiene constante la concentración del sustrato RGSZ2 (1 μM). WB: *western-blot*.

La HINT1 eliminó al SUMO1 eficazmente de la RGSZ2 tras haber intercambiado el tampón de sumoilación y en presencia de Ca^{2+} -CaM. Estos resultados son similares a los descritos anteriormente con la RanGAP1. Además, se confirmó también con la RGSZ2 que la actividad SUMO proteasa de la HINT1 es máxima con una concentración de 10 mM de CaCl_2 (Figura 38).

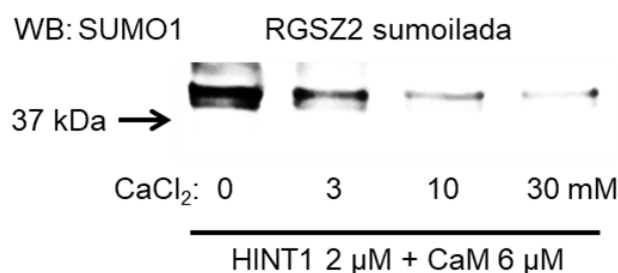


Figura 38. La HINT1 desumoiló a la RGSZ2 sumoilada de manera dependiente de Ca^{2+} -CaM. Se establecieron unas concentraciones constantes de la HINT1 (2 μM) y la CaM (6 μM), y se incrementó la concentración de CaCl_2 presente en el tampón de desumoilación. RGSZ2 sumoilada (1 μM). WB: *western-blot*.

Para garantizar que la actividad enzimática de la HINT1 fuese reproducible en otras investigaciones, se consiguió la proteína HINT1 recombinante de la empresa *Abcam* (*ab87362*). De este modo, se pudo analizar en paralelo la actividad SUMO proteasa de ambas HINT1 promovida por Ca^{2+} -CaM sobre la RGSZ2 sumoilada, obteniendo resultados similares para las dos proteínas (Figura 39A). Asimismo, tanto la actividad SUMO proteasa de la HINT1, como de la SENP1 y la SENP2, sobre la RGSZ2 sumoilada, preservó la proteína nativa, que se detectó en su peso teórico a 25 kDa. Por otra parte, se llevó a cabo una curva de concentraciones crecientes de la HINT1, observando que la actividad máxima SUMO proteasa de la HINT1 para 1 μM de RGSZ2 sumoilada se obtiene con 2 μM de la enzima. (Figura 39B).

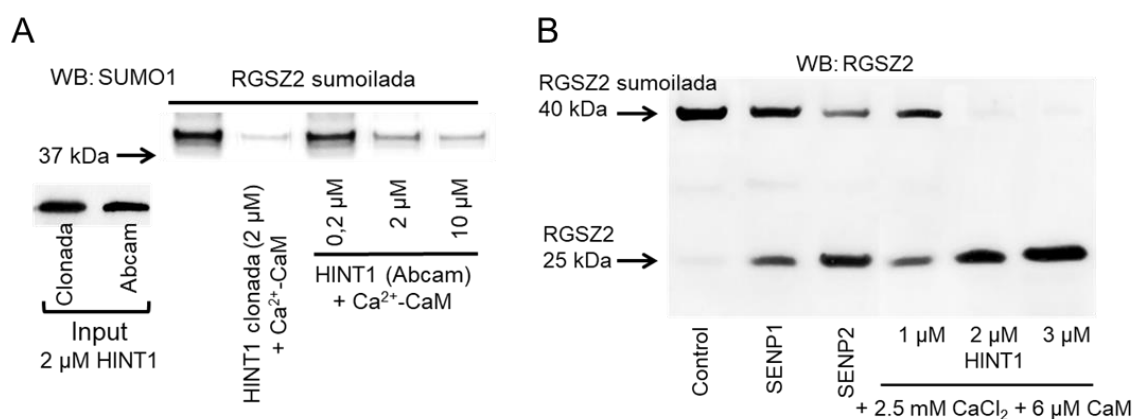


Figura 39. (A) La proteína HINT1 comercial de *Abcam* (*ab87362*) manifestó una actividad SUMO proteasa similar a lo observado con nuestra HINT1 clonada. En el *blot* de la izquierda se muestran las cantidades empleadas de ambas HINT1. (B) SENP1, SENP2 y HINT1 manifestaron una actividad sumoilasa que preserva la RGSZ2 nativa. CaCl_2 (2,5 mM), CaM (6 μM), SENP1/2 (0,3 μM), RGSZ2 sumoilada (1 μM). WB: *western-blot*.

Se empleó un tercer sustrato de sumoilación para analizar esta actividad enzimática de la HINT1. Estudios previos no han descrito la sumoilación del factor de transcripción ICD de la teneurina 1. Sin embargo, el predictor informático *GPS-SUMO* (Zhao y col., 2014) indicó varios sitios susceptibles de sumoilación en esta proteína. Por ello, se llevaron a cabo ensayos de sumoilación con las condiciones establecidas previamente y utilizando el ICD de la teneurina 1 recombinante como sustrato (1 μM). Así, se obtuvieron varias bandas de sumoilación a distintos pesos moleculares, siendo la HINT1 (2 μM) y la SENP2 (0,3 μM) capaces de eliminarlas (Figura 40).

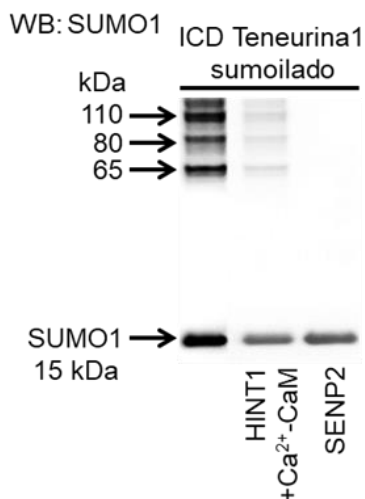


Figura 40. El ICD de teneurina 1 se sumoiló, y la HINT1 y la SENP2 fueron capaces de eliminar el SUMO1 de este sustrato. ICD de teneurina 1 (1 μ M), HINT1 (2 μ M), CaCl₂ (2,5 mM), CaM (6 μ M), SENP1/2 (0,3 μ M). WB: *western-blot*.

Por tanto, la HINT1 manifestó una actividad isopeptidasa sobre diferentes sustratos como la RanGAP1, la RGSZ2 y el ICD de la teneurina 1, aun no estableciendo uniones estables con todos ellos. No obstante, las condiciones óptimas para la actividad SUMO proteasa de la HINT1 coincidieron para los tres sustratos: intercambio del tampón de sumoilación y presencia de Ca²⁺-CaM. Estos primeros estudios de desumoilación permitieron equilibrar las concentraciones de los diferentes elementos de la reacción para maximizar la actividad isopeptidasa de la HINT1: 1 μ M de sustrato, 2 μ M de la HINT1, 6 μ M de la CaM y 2,5 mM de CaCl₂.

2.4. Efecto de TpGc y TpAd sobre la actividad SUMO proteasa de la HINT1

Diferentes grupos de investigación han descrito la actividad hidrolasa de la HINT1 sobre adenosina-5'-*O*-monofosforamidatos (AMP-NH₂) y acil-adenilatos (Brenner y col., 2002; Chou y col., 2007a). Esta actividad es promovida por el sustrato TpAd e inhibida por TpGc (Bardaweel y col., 2011; Bardaweel y col., 2012). En nuestro estudio analizamos el posible efecto de estos compuestos sobre la actividad isopeptidasa de la HINT1. Observamos que concentraciones crecientes de estos compuestos inhibieron de forma dosis dependiente la actividad SUMO proteasa de la HINT1 sobre la RanGAP1 (Figura 41). Así, la concentración del TpAd que inhibió el 50% de la actividad isopeptidasa de la HINT1 (EC₅₀) fue 320 nM, mientras que la EC₅₀ del TpGc fue 403 nM. Por tanto, estos compuestos interfirieron en la actividad SUMO proteasa de la HINT1, lo que sugiere que el núcleo catalítico de la actividad hidrolasa participa en la actividad isopeptidasa, pero sujeto a diferente regulación.

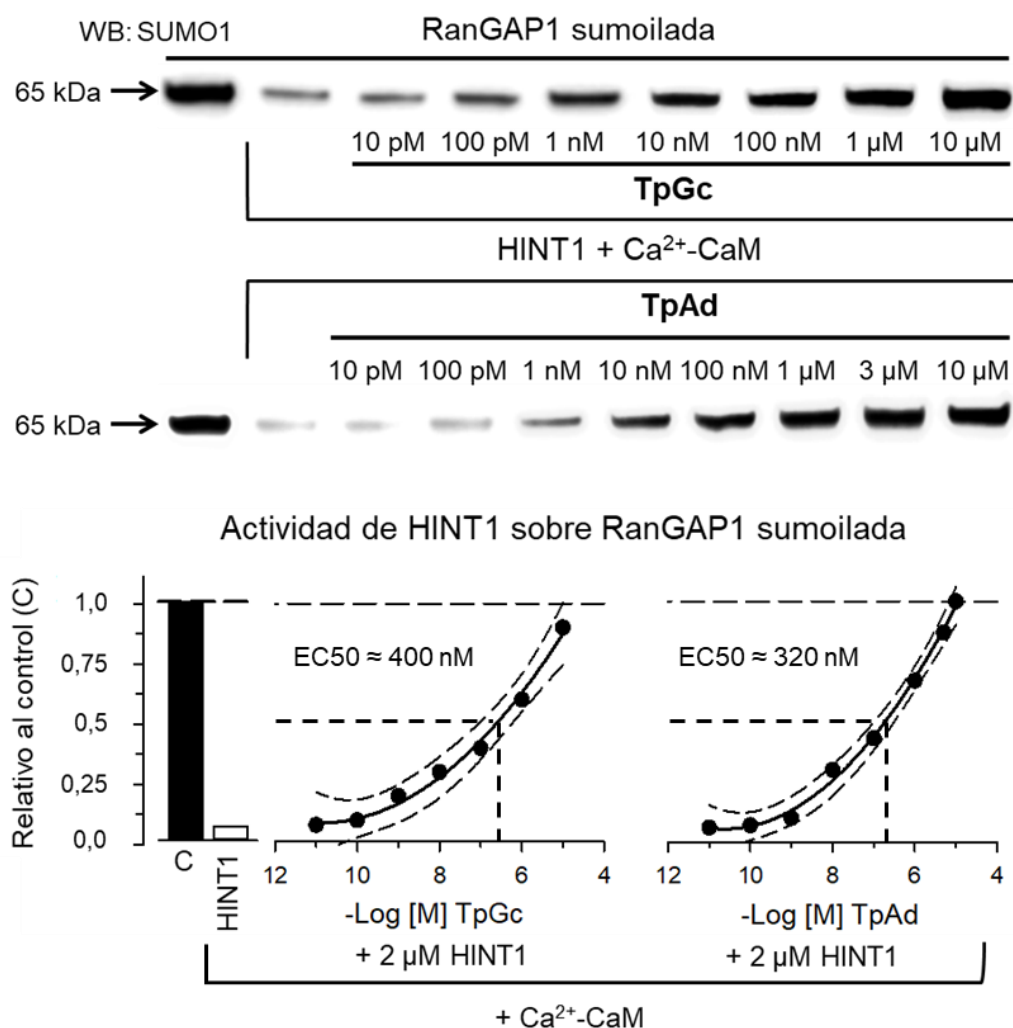


Figura 41. Inhibición dosis dependiente de la actividad SUMO proteasa de la HINT1 por compuestos que afectan a su actividad hidrolasa. En el primer y segundo *blot* se muestra el efecto de concentraciones crecientes de TpGc o TpAd sobre la actividad SUMO proteasa de la HINT1 promovida por Ca²⁺-CaM. Los datos se analizaron mediante regresión no lineal (*Sigmaplot/Sigmastat v 14.0*). TpGc (estimado \pm error estándar): $r = 0,93 \pm 0,12$; $EC_{50} = 403,18 \pm 12,2$ nM; $t = 16,13$; grados de libertad totales = 7; cuadrado de la media = 0,22; $p < 0.05$. TpAd (estimado \pm error estándar): $r = 0,97 \pm 0,11$; $EC_{50} = 320,78 \pm 15,85$ nM; $t = 19,31$; grados de libertad totales = 7; cuadrado de la media = 0,39; $p < 0.05$. Se muestra el ajuste de la curva y los intervalos del 95% de confianza.

2.5. Los iones metálicos divalentes alteran la actividad SUMO proteasa de la HINT1

La capacidad de la HINT1 para hidrolizar fosforamidados y acil-adenilatos se bloquea por cationes divalentes (Shah y col., 2017). Por ello, se analizó el efecto de una serie de iones metálicos sobre la actividad sumoilasa de la HINT1. Tras la sumoilación de la RanGAP1, se intercambié el tampón de la mezcla y añadimos la HINT1 (2 μM) junto con Ca²⁺-CaM (6 μM) y concentraciones crecientes de las sales de cloruro de los metales divalentes (3-30-300 μM), previamente disueltas en agua. La presencia de los iones Cu²⁺,

Zn^{2+} y Ni^{2+} disminuyó la actividad SUMO proteasa de la HINT1 activada por Ca^{2+} -CaM. Aunque se había observado que 10 mM de Mg^{2+} abolía el efecto activador de Ca^{2+} -CaM sobre la actividad SUMO proteasa de la HINT1 (Figura 34B), las concentraciones inferiores a 300 μ M de Mg^{2+} o Mn^{2+} no afectaron a dicha actividad de la HINT1 (Figura 42).

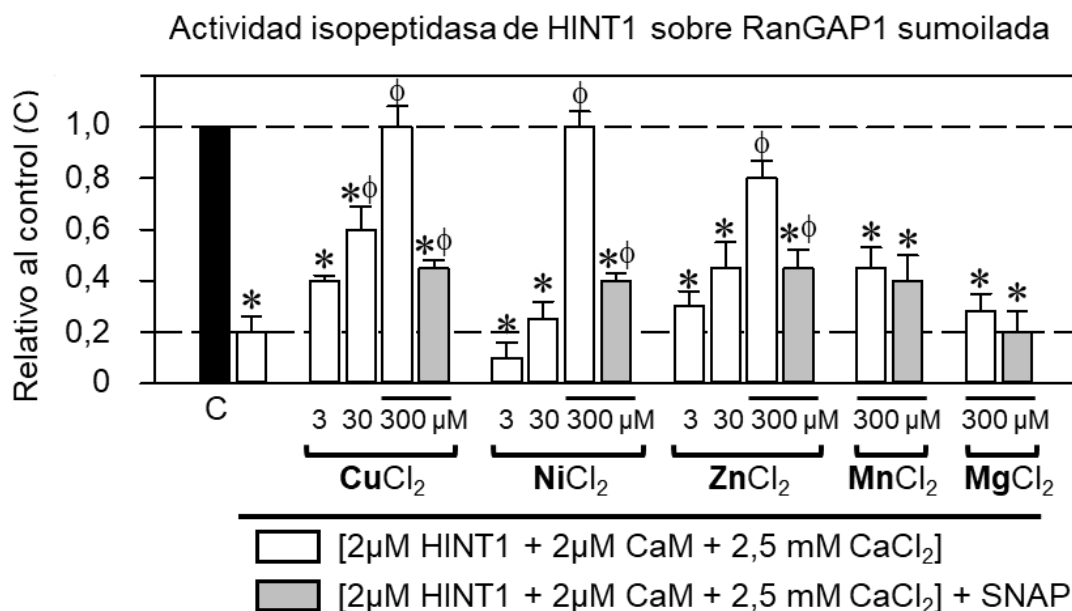


Figura 42. Efecto de los iones metálicos divalentes sobre la actividad de la HINT1. Sobre el tampón de desumoilación de la HINT1 (2 μ M) activada por Ca^{2+} -CaM (6 μ M) se añadieron concentraciones de 3, 30 y 300 μ M de las sales de cloruro de Cu, Ni, Zn, Mn y Mg. El efecto de la concentración de 300 μ M de estas sales metálicas también se estudió en presencia del SNAP (100 μ M). Cada barra es la media \pm ESM de tres ensayos independientes. Los datos están referidos a los niveles de la RanGAP1 sumoilada al final de la fase de sumoilación, sin haber añadido la HINT1 (grupo control; valor arbitrario de 1). “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control; “ ϕ ” estadísticamente significativo respecto al grupo que ha recibido la HINT1, pero no ion metálico. ANOVA, test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; $p < 0,05$.

Las cisteínas y las histidinas son los aminoácidos que presentan una mayor afinidad por los cationes metálicos divalentes como el Cu^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} (Zheng y col., 2008). El NO desestabiliza la unión de estos cationes a los grupos tioles de las cisteínas, pero no altera su unión sobre las histidinas (Maret, 2006). En presencia de un donante de NO denominado SNAP (100 μ M) se redujo la capacidad de los iones Cu^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} para antagonizar la actividad SUMO proteasa de la HINT1 (Figura 42). Esto sugiere que el NO, al liberar alguna cisteína de su bloqueo por los iones metálicos, promueve la actividad isopeptidasa de la HINT1.

Para confirmar la implicación del NO en la actividad isopeptidasa de la HINT1, se estudió el comportamiento del mutante T17A de la HINT1, localizado en el sitio de unión a la CaM. Así, en presencia de Ca^{2+} -CaM este mutante puntual no manifestó ninguna capacidad sumoilasa que, sin embargo, sí exhibió cuando esta actividad enzimática fue promovida por el SNAP (Figura 43). Por tanto, existen dos vías de activación de la actividad sumoilasa de la HINT1, una mediada por Ca^{2+} -CaM y la otra dependiente del NO.

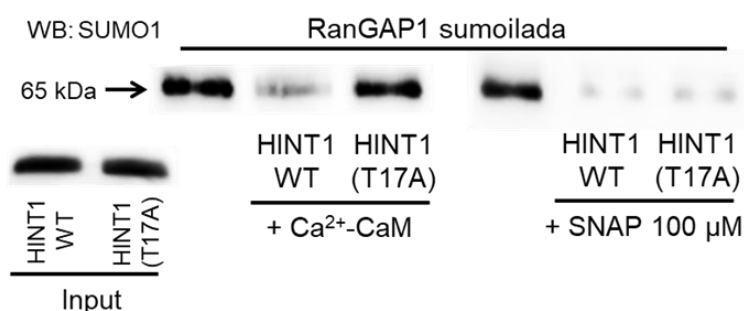


Figura 43. El mutante HINT1 T17A no manifiesta actividad SUMO proteasa en presencia de Ca^{2+} -CaM, pero sí con el donante de NO, SNAP. El *blot* de la izquierda muestra las cantidades empleadas en el ensayo de la HINT1 WT y su mutante puntual T17A. Los dos *blot* de la derecha indican la actividad isopeptidasa de las HINT1 WT y T17A activadas por Ca^{2+} -CaM o SNAP, respectivamente, sobre la RanGAP1 sumoilada. HINT1 WT y T17A (2 μM), CaCl_2 (2,5 mM), CaM (6 μM), SNAP (100 μM). WB: *western-blot*.

Una vez desvelada la capacidad del NO de promover la actividad isopeptidasa de la HINT1, analizamos la cinética de esta actividad enzimática en función de si el activador era la Ca^{2+} -CaM o el SNAP. Con este objetivo, y tras llevar a cabo la sumoilación de la RGSZ2, se intercambió el tampón del ensayo y se iniciaron las reacciones de desumoilación, llevando en paralelo la HINT1 activada por la Ca^{2+} -CaM o el SNAP. Las reacciones se interrumpieron a diferentes tiempos: 10, 20, 30, 45 y 60 minutos, y posteriormente se analizaron por *western-blot*.

Se determinó que 10 minutos es el tiempo que requiere la HINT1 activada por el SNAP para eliminar el 50% del SUMO1 (T50) de la RGSZ2, mientras que si el promotor de la actividad SUMO proteasa de la HINT1 es la Ca^{2+} -CaM, este tiempo se amplía hasta los 14 minutos (Figura 44).

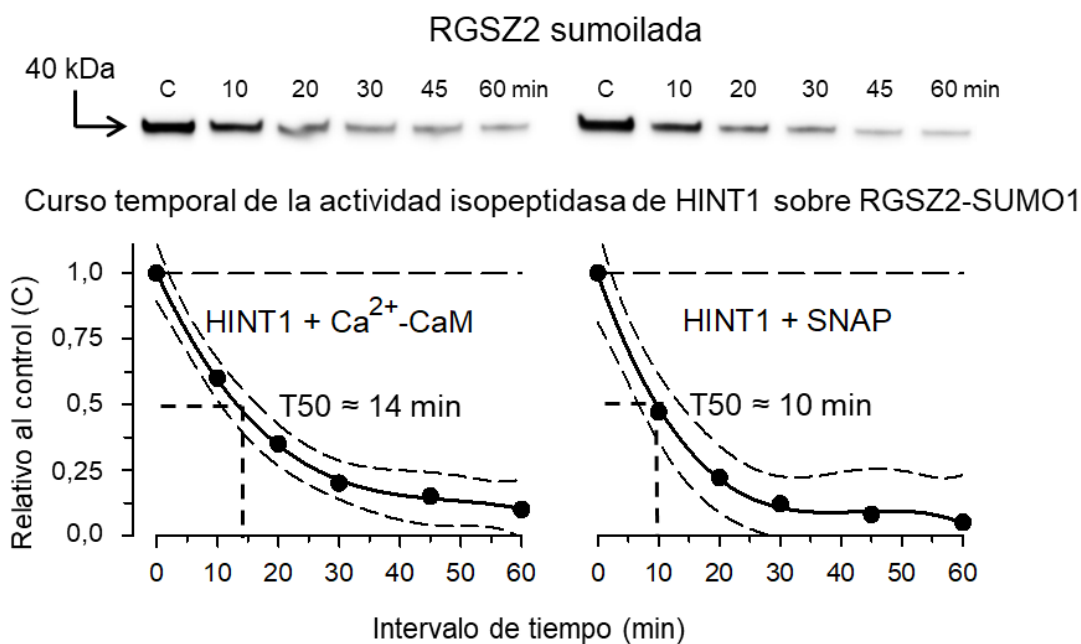


Figura 44. Curso temporal de la actividad isopeptidasa de la HINT1 activada por Ca^{2+} -CaM o SNAP. La primera calle de ambos *blot* corresponde al control (C), los niveles de la RGSZ2 sumoilada incubada con la HINT1 sin activador. Las calles siguientes muestran el nivel de actividad de la HINT1 promovida por Ca^{2+} -CaM o SNAP, en el primer y segundo *blot*, respectivamente. Los datos se analizaron mediante una regresión no lineal (*Sigmaplot/Sigmastat v 14.0*). Actividad de HINT1+ Ca^{2+} -CaM (estimado \pm error estándar): $r = 0,97 \pm 0,04$; $T50 = 12,35 \pm 0,27$ min; $t = 37,21$; grados de libertad totales = 6; cuadrado de la media = 0,26; $p < 0,05$. Actividad de HINT1+SNAP (estimado \pm error estándar): $r = 0,99 \pm 0,07$; $T50 = 6,31 \pm 0,23$ min; $t = 57,79$; grados de libertad totales = 6; cuadrado de la media = 0,215; $p < 0,05$. Se muestra el ajuste de la curva y los intervalos del 95% de confianza.

Para corroborar la inhibición por iones metálicos divalentes de la actividad SUMO proteasa de la HINT1 se evaluó el efecto de ZnCl_2 después de haber comenzado la reacción de desumoilación. Tras sumoilar la RGSZ2 e intercambiar el tampón de sumoilación, se agregó la HINT1 junto con la Ca^{2+} -CaM o el SNAP a la mezcla de sumoilación, y se dejó 15 minutos de reacción, tiempo en el que se había visto previamente que se eliminaba el 50 % del SUMO1 de la RGSZ2. Pasado este periodo, se añadió a la mezcla 300 μM de ZnCl_2 y se reanudó la reacción hasta alcanzar los 60 minutos totales de la fase de desumoilación. La mezcla resultante se analizó por *western-blot*, observándose que la adición del ZnCl_2 bloquea la actividad SUMO proteasa de la HINT1 cuando está promovida por la Ca^{2+} -CaM. No obstante, el ion metálico no tuvo ningún efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de la HINT1 en presencia del SNAP, el donante de NO (Figura 45A).

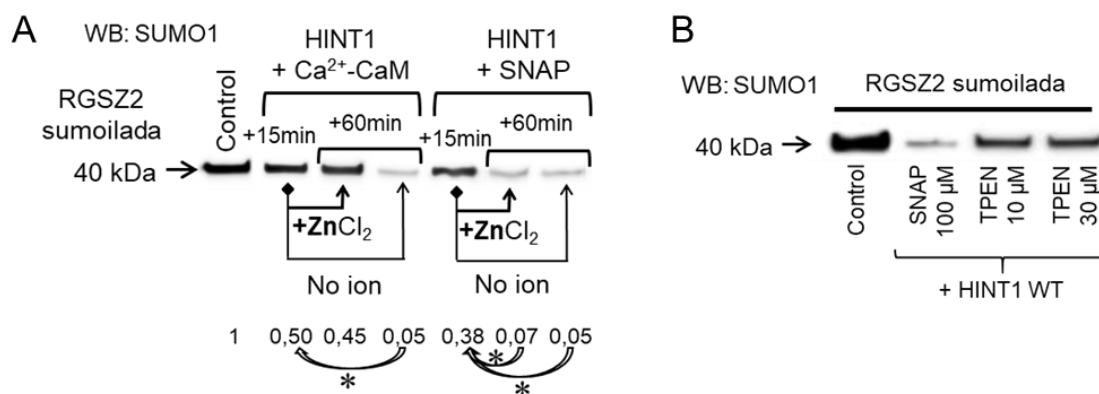


Figura 45. Efecto de los iones de zinc en la actividad de la HINT1 sobre la RGSZ2 sumoiledada. (A) El ZnCl₂ se añade tras 15 minutos de desumoilación bloqueando la actividad isopeptidasa de la HINT1 promovida por Ca²⁺-CaM, pero sin tener efecto cuando el SNAP es el activador. HINT1 (2 μM), SNAP (100 μM), CaCl₂ (2,5 mM), CaM (6 μM), RGSZ2 sumoiledada (1 μM) y ZnCl₂ (300 μM). Los datos están referidos al grupo control, que no incluye HINT1 y al que se ha asignado un valor arbitrario de 1; “*” diferencia significativa con respecto al grupo con Ca²⁺-CaM o SNAP de 15 minutos. ANOVA, test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; p < 0,05. (B) El quelante de metales pesados TPEN usado a las concentraciones indicadas promueve la actividad SUMO proteasa de la HINT1 en ausencia de Ca²⁺-CaM y SNAP. HINT1 (2 μM), SNAP (100 μM), TPEN (10 y 30 μM), RGSZ2 sumoiledada (1 μM).

Por tanto, la CaM activada por calcio eliminaría el zinc presente en la HINT1 sin alterar el sitio de unión del metal a la enzima, permitiendo que nuevos iones se asociasen con los mismos residuos de cisteína y se volvería a bloquear la actividad isopeptidasa. Por el contrario, el NO promueve la S-nitrosilación de los grupos tioles de las cisteínas de la HINT1. De este modo, el ion metálico no puede unirse a estos aminoácidos, y la enzima continúa activa, al menos, hasta que se regeneren los grupos tiol de las cisteínas de la HINT1 y vuelvan a unir zinc. En consecuencia, los iones libres de zinc se oponen a la activación de la HINT1 mediada por Ca²⁺-CaM pero no por NO.

Además, el quelante de metales pesados TPEN promovió la actividad de la HINT1 tanto en ausencia de SNAP como de Ca²⁺-CaM (Figura 45B). Estos resultados sugieren que la actividad SUMO proteasa de la HINT1 se inhibe por cationes metálicos divalentes, y que su eliminación del sitio catalítico libera la actividad enzimática.

2.6. Identificación del centro catalítico de la HINT1

Por consiguiente, los iones metálicos inhiben la actividad SUMO proteasa de la HINT1, situación que se previene, e incluso se revierte, con NO. El óxido nítrico actúa sobre los grupos tioles de las cisteínas promoviendo la salida de estos iones, lo que

restituye la funcionalidad del centro catalítico. Apoyándonos en estos resultados previos y a fin de identificar la(s) cisteína(s) implicadas en el centro catalítico, se clonó la HINT1 con mutaciones puntuales en las cisteínas de su secuencia, HINT1 C38S y HINT1 C84S y, a continuación, se evaluó la actividad isopeptidasa de estos mutantes (Figura 46).

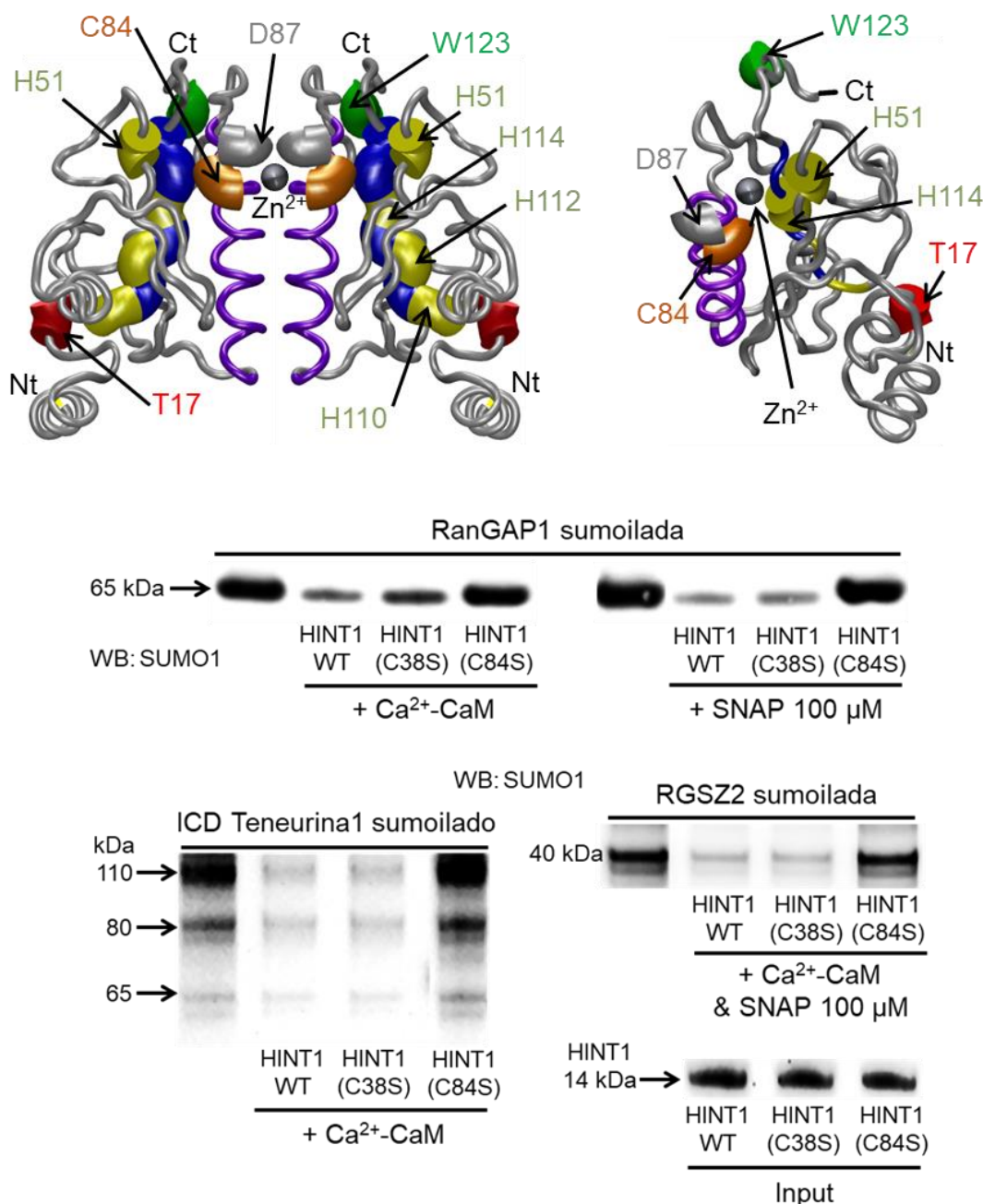


Figura 46. Identificación de la cisteína del centro catalítico. Se muestra como un tubo gris la estructura tridimensional del dímero (izquierda) y del monómero (derecha) de la HINT1. Se destacan los aminoácidos de interés como cilindros coloreados, con el átomo de Zn²⁺ en la zona del centro catalítico. Los modelos estructurales de HINT1 se han diseñado con el programa *Novafold*. En los *blot* se analiza la actividad sumoilasa de la HINT1 WT, HINT1 C38S y HINT1 C84S (2 μM), activadas por Ca²⁺-CaM (6 μM) o SNAP (100 μM), sobre los sustratos sumoilados RanGAP1, ICD de teneurina 1 y RGSZ2 (1 μM). Abajo a la derecha están las cantidades de las tres formas de la HINT1 empleadas en los ensayos. WB: *western-blot*.

La HINT1 C38S, ya sea activada por Ca^{2+} -CaM o SNAP, mostró actividad sobre los diferentes sustratos sumoilados usados en el estudio (RanGAP1, RGSZ2 e ICD de teneurina 1). Sin embargo, observamos que la HINT1 C84S carece de actividad (Figura 46). Por tanto, la mutación o bloqueo de la cisteína 84, que formaría parte del centro catalítico, impidió la actividad SUMO proteasa de la HINT1.

Las familias de SUMO proteasas ya descritas, como las SENP, DeSI (*desumoylating isopeptidase*) y USLP1 (*ubiquitin-specific protease-like 1*), contienen un centro catalítico configurado por una tríada histidina-aspártico-cisteína en el caso de las SENP y USLP1, o una díada histidina-cisteína en las DeSI (Barret y Rawlings, 2001; Drag y Salvesen, 2008; Schulz y col., 2012). Gracias a las predicciones de la estructura tridimensional de la HINT1 pudimos proponer ciertos aminoácidos como posibles colaboradores de la cisteína 84 en el centro catalítico. En este sentido, se produjo el mutante HINT1 D87V que carece de actividad sumoilasa tanto en ausencia como en presencia de SNAP (Figura 47A).

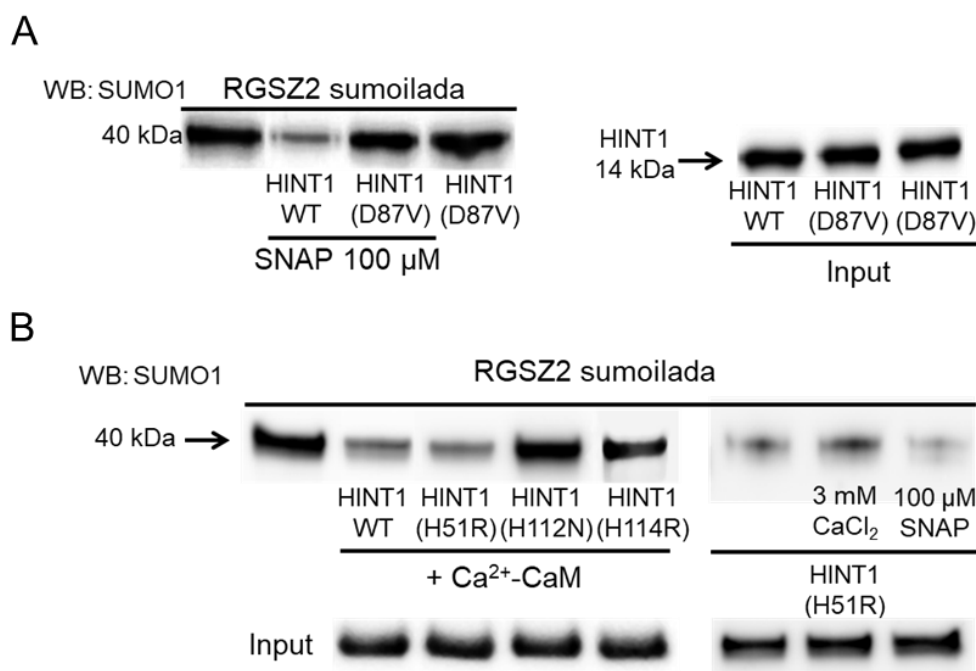


Figura 47. Identificación de otros aminoácidos involucrados en el centro catalítico para la actividad SUMO proteasa de la HINT1. (A) En el *blot* de la izquierda se muestra que el mutante D87V de la HINT1 no manifestó actividad isopeptidasa ni en presencia ni en ausencia de SNAP. El *blot* de la derecha muestra las cantidades empleadas de las dos variantes de la HINT1 en los ensayos. (B) Actividad isopeptidasa de las diferentes mutaciones en las histidinas susceptibles de formar parte del centro catalítico de la HINT1: H51R, H112N y H114R. La HINT1 H51R se analizó en ausencia o presencia de activador (Ca^{2+} -CaM o SNAP) ó 3 mM de CaCl_2 . El *blot* inferior corresponde a las cantidades empleadas de las diferentes variantes de la HINT1 en los ensayos. HINT1 (2 μM), CaCl_2 (2,5 mM), CaM (6 μM), SNAP (100 μM), RGSZ2 sumoilada (1 μM). WB: *western-blot*.

Por otra parte, se prepararon diferentes mutaciones de la proteína HINT1 en las que se modificaron las histidinas posiblemente involucradas en el centro catalítico, tales como H51R, H112N y H114R. Las dos histidinas del dominio HIT (histidinas 112 y 114) no manifestaron ninguna actividad SUMO proteasa. Por el contrario, el mutante en la histidina 51 presentó una actividad isopeptidasa espontánea, desregulada, ya que no requirió de la presencia de ningún activador (ni Ca^{2+} -CaM ni SNAP) para desumoiar a la RGSZ2 (Figura 47B). Por tanto, la ausencia de actividad isopeptidasa del mutante D87V de la HINT1 sugiere su participación en la tríada catalítica, aunque no se concluyó cuál de las tres histidinas analizadas podría estar implicada.

2.7. Regulación de la actividad SUMO proteasa de la HINT1 por proteínas de señalización

La HINT1 establece interacciones con diferentes proteínas en la membrana plasmática, entre ellas el MOR y la subunidad NR1 del receptor ionotrópico de glutamato NMDA (Guang y col., 2004; Rodríguez-Muñoz y col., 2015a). La HINT1 y el σ 1R no forman uniones estables, pero ambas proteínas coordinan la regulación cruzada existente entre ciertos GPCR y los NMDAR (Rodríguez-Muñoz y col., 2015b). En el siguiente paso del estudio se analizó si la interacción de la HINT1 con estas proteínas de la membrana plasmática podría alterar su actividad SUMO proteasa.

Con este fin, se incubó la HINT1 activada por la Ca^{2+} -CaM con concentraciones crecientes del σ 1R, desde diez veces menos que la concentración de la HINT1 hasta una proporción 1:1 de σ 1R-HINT1. Así, se observó que el σ 1R reduce de forma dosis-dependiente la actividad SUMO proteasa de la HINT1, provocando una inhibición completa cuando la proporción entre ambas proteínas es equivalente. Sin embargo, la actividad de la SENP2 no se afectó por la presencia del σ 1R (Figura 48A).

Además, se llevaron a cabo experimentos similares con los segmentos carboxilo terminales de la subunidad NR1 del receptor de NMDA y del MOR. La presencia de la subunidad NR1 en la mezcla de desumoiación bloqueó la actividad de la HINT1 de forma similar al σ 1R, mientras que el MOR no modificó la actividad enzimática de la HINT1 (Figura 48B). Por tanto, ambas proteínas, NR1 y σ 1R regularían la actividad isopeptidasa de la HINT1.

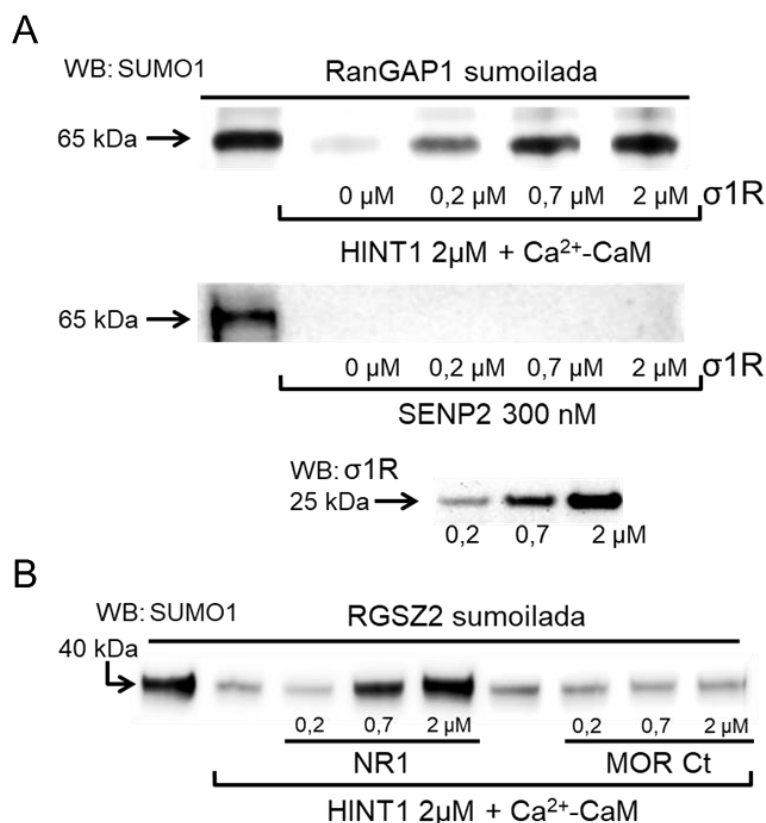


Figura 48. Efecto de proteínas de señalización sobre la actividad isopeptidasa de la HINT1. (A) La isoforma larga del σ 1R redujo, de forma dosis dependiente, la actividad de la HINT1, pero no de la SENP2. En el último *blot* se muestran las cantidades empleadas del σ 1R. (B) La subunidad NR1 del NMDAR bloqueó la actividad de la HINT1, al contrario que la región C-terminal del MOR. HINT1 (2 μ M), CaCl₂ (2,5 mM), CaM (6 μ M), SENP2 (300 nM), RanGAP1 y RGSZ2 sumoiladas (1 μ M). WB: *western-blot*.

2.8. Regulación *in vivo* de la actividad SUMO proteasa de la HINT1

Una vez analizada *in vitro* la actividad isopeptidasa de la HINT1 en distintas condiciones y con diferentes reguladores, exploramos el posible significado de esta regulación *in vivo*. Para ello, a diferentes grupos de ratones se administraron por vía icv distintos fármacos como el NMDA, agonista del NMDAR, y los antagonistas del σ 1R, S1RA y BD1063. Tras la inyección de estos compuestos se observa *ex vivo* una reducción en la asociación de las subunidades NR1 del NMDAR y del σ 1R con los complejos MOR-HINT1 (Rodríguez-Muñoz y col., 2013; Rodríguez-Muñoz y col., 2015a).

A los 30 minutos de la administración de los compuestos, los ratones fueron sacrificados y las estructuras cerebrales extraídas. Se prepararon las membranas sinaptosomales de la corteza cerebral correspondientes a 8 ratones para cada fármaco estudiado y se procedió a las determinaciones *ex vivo*. Se inmunoprecipitó al MOR

utilizando un anticuerpo frente al segundo bucle extracelular del receptor. Por *western-blot* se analizó la co-precipitación de la RGSZ2 con el MOR, empleando dos anticuerpos contra diferentes epítomos de la RGSZ2. Mientras que la asociación de la RGSZ2 con el MOR apenas se detectó en el grupo control, ésta aumentó significativamente en respuesta al NMDA y a los antagonistas del σ 1R (Figura 49).

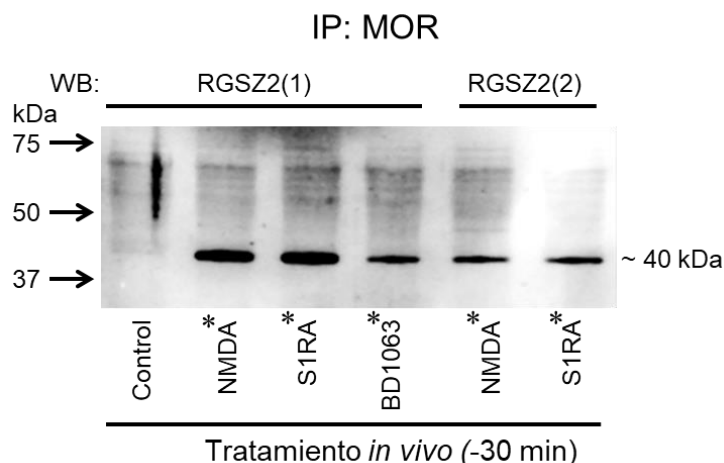


Figura 49. La administración icv del NMDA, un agonista del NMDAR, o antagonistas del σ 1R, S1RA y BD1063, potenció la coprecipitación de la RGSZ2 con el MOR. Los ratones se sacrificaron 30 minutos post-inyección y se emplearon las membranas sinaptosomales de la corteza para las determinaciones *ex vivo*. Se detectó la RGSZ2 con dos anticuerpos dirigidos contra dos dominios diferentes. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control. ANOVA, test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; $p < 0,05$. IP: inmunoprecipitación; WB: *western-blot*.

Siguiendo el mismo protocolo, se administró el NMDA vía icv a ratones KO de la HINT1 y del σ 1R, con el correspondiente grupo de animales control WT. Aunque el NMDA promovió la asociación MOR-RGSZ2 en los ratones WT, el efecto fue más acusado en los animales σ 1R^{-/-}, mientras que en los KO de la HINT1 no se observó ninguna interacción (Figura 50A). La ausencia de señal en los ratones deficientes en la HINT1 concuerda con los resultados previos que muestran que la unión MOR-RGSZ2 no es directa, sino que la HINT1 actúa como nexo (Rodríguez-Muñoz y col., 2011a). Además, la detección con un anticuerpo frente al SUMO reveló que la proteína RGSZ2 que co-precipitaba con el MOR está sumoilada (Figura 50B).

Por tanto, el NMDAR y el σ 1R regularían negativamente la interacción de la HINT1 con la RGSZ2 sumoilada *in vivo*. Los fármacos que reducen la asociación del complejo MOR-HINT1 con NMDAR- σ 1R permitirían la asociación de la HINT1 con la RGSZ2 sumoilada y liberarían su actividad isopeptidasa.

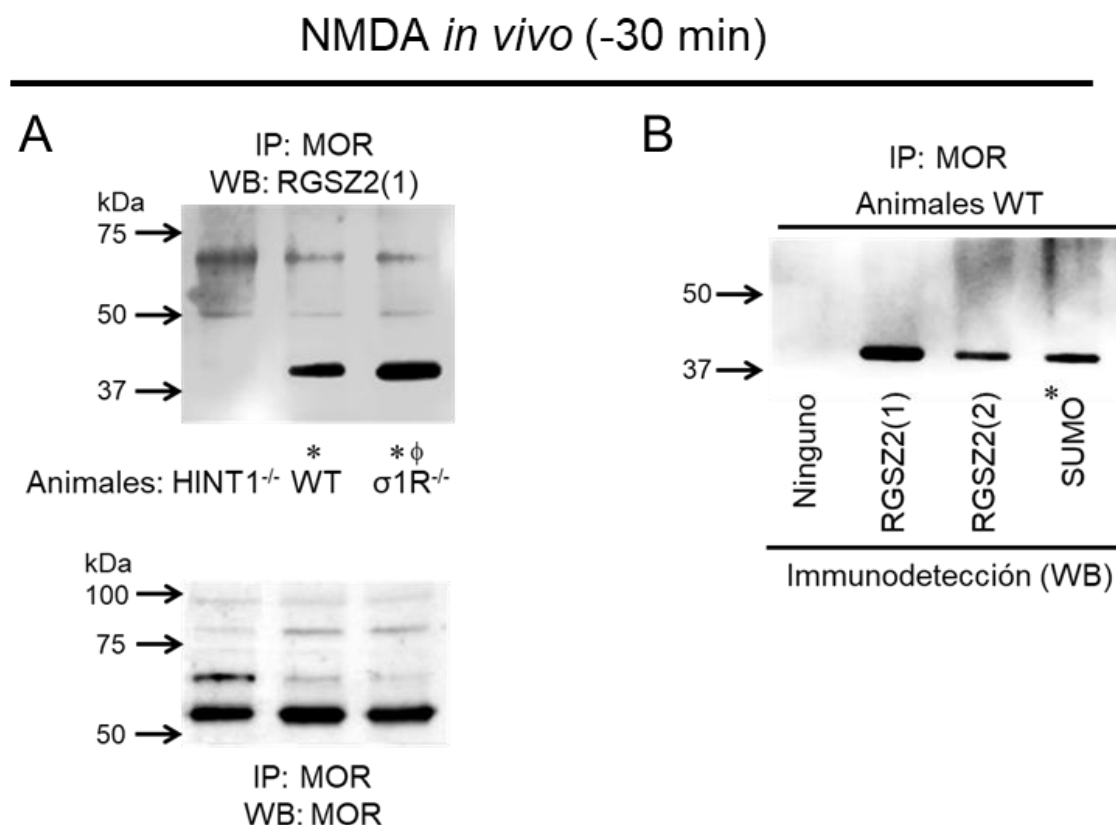


Figura 50. Asociación de la RGSZ2 sumoilada con el MOR en ratones KO de la HINT1 o del σ 1R. (A) La administración del NMDA *in vivo* produjo un aumento de la co-precipitación de la RGSZ2 con el MOR en ratones WT y σ 1R^{-/-}, pero no en los ratones HINT1^{-/-}. En el *blot* inferior se muestran los niveles comparables del MOR precipitado en los tres grupos de ratones. “*” Estadísticamente significativo respecto a HINT1^{-/-}. “φ” Estadísticamente significativo respecto al grupo WT. (B) La RGSZ2 asociada al MOR tras la administración del NMDA estaría sumoilada. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control. (A y B) ANOVA, test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; $p < 0,05$. IP: inmunoprecipitación; WB: *western-blot*.

En resumen, nuestros resultados mostraron que la HINT1 posee actividad SUMO proteasa y que esta actividad enzimática no se comparte por la HINT2 ni la HINT3. La HINT1 posee un sitio de unión a CaM en su extremo N-terminal y un dominio SIM alternado con la triada de histidinas características de la familia HIT.

La actividad SUMO proteasa de la HINT1 se inhibió por la unión de iones zinc a la cisteína 84 del centro catalítico. Estos iones se eliminaron por la Ca²⁺-CaM y el NO, promoviendo así la actividad isopeptidasa de la HINT1. Además, la unión de ciertas proteínas como la subunidad NR1 del NMDAR y el σ 1R a la HINT1 regularon su actividad sumoilasa.

3. Caracterización molecular de los mutantes de la HINT1 causantes de ARAN-NM

3.1. Localización en la secuencia de la HINT1 de las mutaciones que causan la ARAN-NM

La proteína HINT1 consta de 126 aminoácidos organizados, según la predicción de *Novafold*, en tres hélices α y cinco láminas β distribuidas a lo largo de la secuencia y conectadas por regiones sin estructura. Hasta este momento se han descrito 15 mutantes de la HINT1 causantes de la ARAN-NM. El análisis de la secuencia de la HINT1 desveló que, aproximadamente la mitad de los residuos mutados se localizan en las láminas β y su presencia es escasa en las hélices α (Figura 51).

Ninguno de los mutantes humanos de la HINT1 se encuentra en el sitio de unión de la CaM, que incluye la región 12–31 QPGGDTIFGKIIRKEIPAKI. Sin embargo, el motivo SIM (113-117 LHVLG) se localiza en una lámina β y en su entorno se han descrito las mutaciones H112N y H114R (Figura 51).

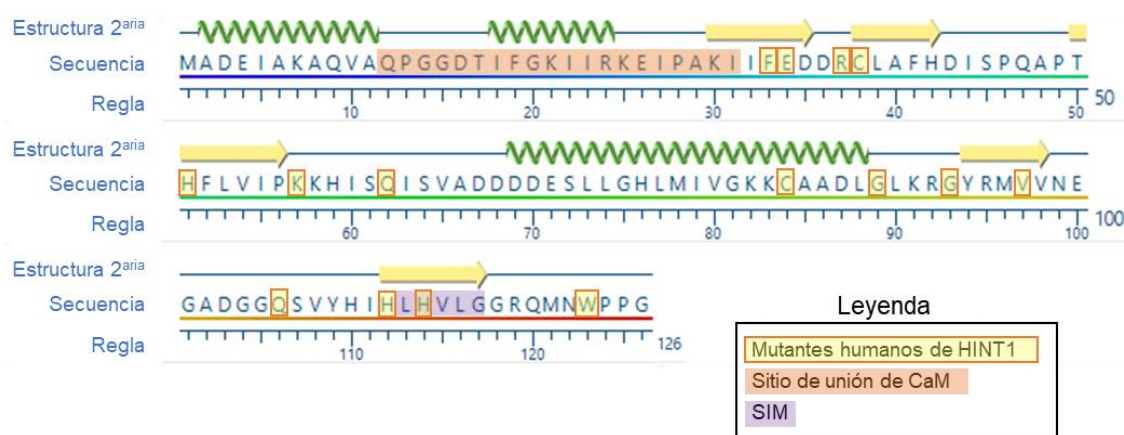


Figura 51. Estructura secundaria de la HINT1. Secuencia de aminoácidos y estructura secundaria de la HINT1 realizada con *Novafold* (DNASTAR). Las hélices α se representan como ondas verdes y las cinco láminas β como flechas amarillas. Se destaca el sitio de unión a la CaM (12-31), el dominio SIM (113-117) y los mutantes humanos de la HINT1.

Asimismo, se han descrito tres mutaciones Q62*, Q106* y W123* que generan proteínas truncadas (Figura 52). En este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización molecular de todos los mutantes de la HINT1 responsables de la ARAN-NM, excepto la mutación Q62* ya que, al carecer de la mitad de la secuencia, incluido el núcleo catalítico propuesto para la actividad SUMO proteasa y el dominio SIM, asumimos su carencia de

función enzimática. En la Figura 52 se muestra el modelo tridimensional de la proteína con la localización de todos los mutantes humanos de la HINT1.

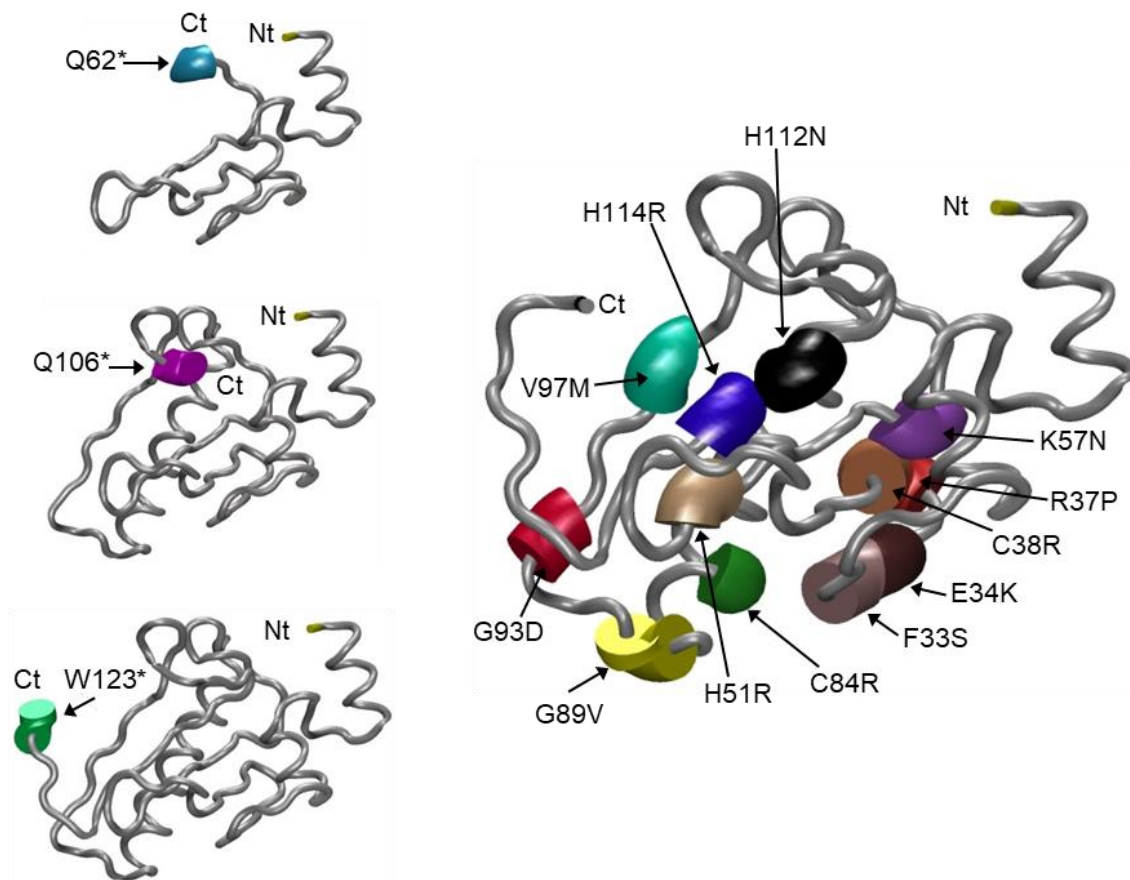


Figura 52. Estructura tridimensional de la HINT1. La HINT1 se representa como un tubo gris con los aminoácidos mutados causantes de la ARAN-NM marcados como cilindros coloreados. En el panel de la izquierda se muestran las 3 mutaciones Q62*, Q106* y W123* que generan proteínas HINT1 truncadas. En el panel de la derecha se muestran todas las mutaciones puntuales descritas de la HINT1 en la ARAN-NM. Los modelos 3D se han realizado con *Novafold (DNASTAR)*.

3.2. Alteración de la actividad SUMO proteasa en los mutantes de la HINT1 relacionados con la ARAN-NM

En un primer momento se analizó cómo las diferentes mutaciones de la HINT1 podrían alterar su actividad SUMO proteasa. Para ello, se sumoiló la RGSZ2 y tras intercambiar el tampón de sumoilación, se añadió la HINT1 mutada correspondiente, en ausencia o presencia de los activadores Ca^{2+} -CaM o SNAP, comparando su actividad con la del control, la HINT1 WT. El resumen de los resultados obtenidos se muestra en la Tabla 6 junto con un *blot* representativo de la actividad de los mutantes de la HINT1 con o sin SNAP (Figura 53).

HINT1	Actividad isopeptidasa	Regulación por Ca ²⁺ -CaM	Regulación por SNAP
WT	Sí	Sí	Sí
F33S	No	No	No
E34K	Sí < WT	No	No
R37P	Sí < WT	No	No
C38R	Sí	No	No
H51R	Sí	No	No
K57N	No	No	No
C84R	No	No	No
G89V	No	No	No
G93D	No	No	No
V97M	No	No	No
Q106*	No	No	No
H112N	No	No	No
H114R	No	No	No
W123*	No	No	No

Tabla 6. Actividad SUMO proteasa de los mutantes de la HINT1 causantes de la ARAN-NM. La mayoría de los mutantes de la HINT1 no manifestaron actividad isopeptidasa excepto E34K, R37P, C38R y H51R, que presentaban actividad, pero desregulada, desumoilando a la RGSZ2 en ausencia de los activadores Ca²⁺-CaM o SNAP. Dentro de este grupo de mutaciones, la actividad de C38R y H51R era similar a la de la HINT1 WT, pero la que exhibían E34K y R37P era sensiblemente inferior.

Muchos de los mutantes humanos de la HINT1 no presentaron actividad SUMO proteasa sobre la RGSZ2, excepto E34K, R37P, C38R y H51R (Tabla 6 y Figura 53). Estas cuatro mutaciones mantuvieron una cierta actividad isopeptidasa sin necesidad de los

activadores de esta función. De estos mutantes, C38R y H51R presentaron una actividad comparable a la de la HINT1 WT, mientras que la de E34K y R37P fue menor (Figura 53).

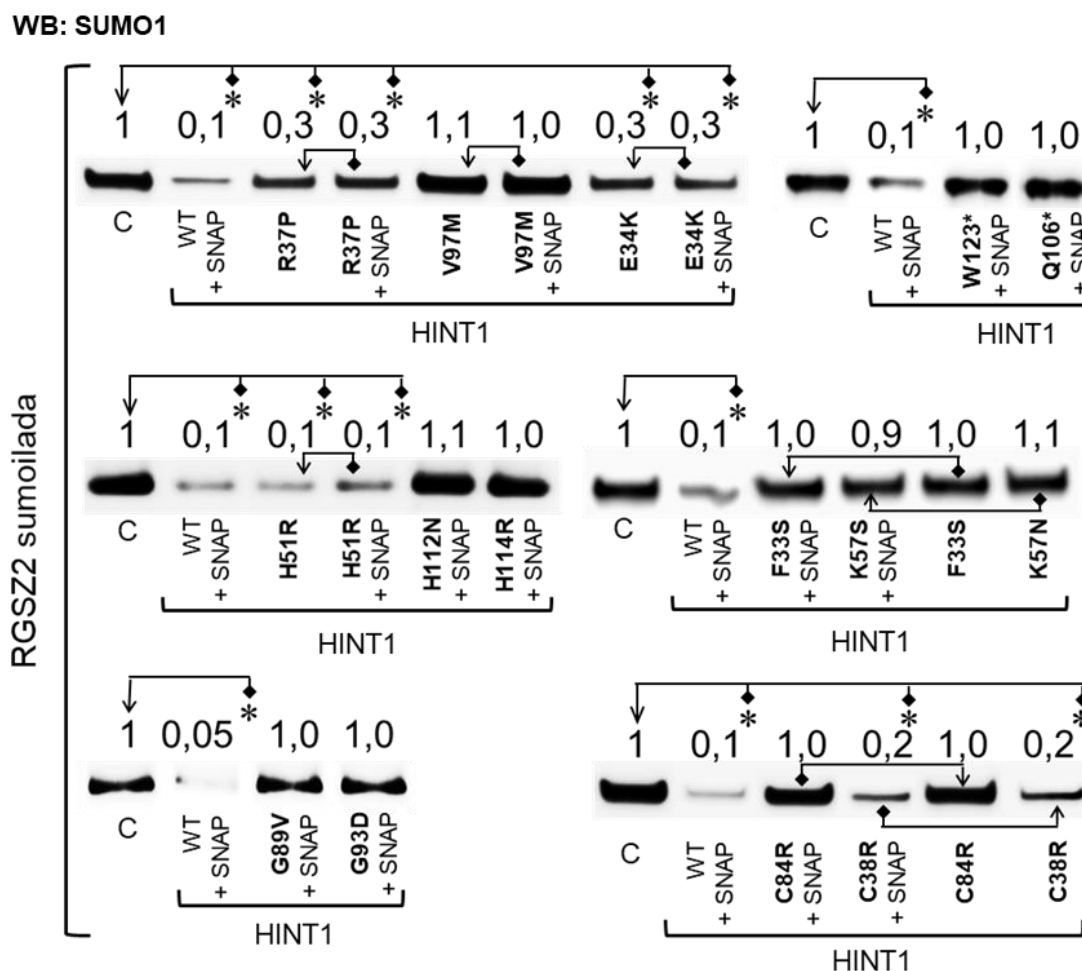


Figura 53. Actividad SUMO proteasa de los mutantes de la HINT1 causantes de la ARAN-NM. La mayoría de los mutantes de la HINT1 no presentaron actividad isopeptidasa excepto E34K, R37P, C38R y H51R, que tenían una actividad desregulada. Se obtuvieron resultados similares con Ca^{2+} -CaM (resultados no mostrados). HINT1 (2 μM), SNAP (100 μM), RGSZ2 sumoilada (1 μM). “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control, al que se le ha asignado el valor arbitrario de 1. ANOVA, test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; $p < 0,05$. WB: *western-blot*.

3.3. Unión al SUMO1 y a la CaM de los mutantes de la HINT1 causantes de la ARAN-NM

Dentro de la secuencia de la HINT1 se encuentra el dominio SIM (113-117 LHVLG) que le permite interactuar con el SUMO. Previamente hemos descrito que las

mutaciones en este sitio SIM, como V115D y L116Q, reducen la formación de los complejos HINT1-SUMO (Figura 31).

De manera similar, se evaluó la capacidad de asociación de los distintos mutantes de la HINT1 causantes del ARAN-NM con el SUMO1. Para ello, se co-incubaron las diferentes mutaciones de la HINT1 (200 nM) con agarosa-SUMO1 (100 nM) en presencia de 2,5 mM CaCl₂ durante 30 minutos a RT en agitación. A continuación, se eliminó la HINT1 no unida y la HINT1 restante se separó por solubilización con el tampón *Laemmli* 2X calentado a 100 °C y posterior filtración. Finalmente, se analizó por *western-blot* la cantidad de HINT1 que se había unido a la agarosa-SUMO1. En la Figura 54 se muestra que todos los mutantes humanos de la HINT1, a excepción de R37P, G89V and G93D, se asociaron débilmente con el SUMO1.

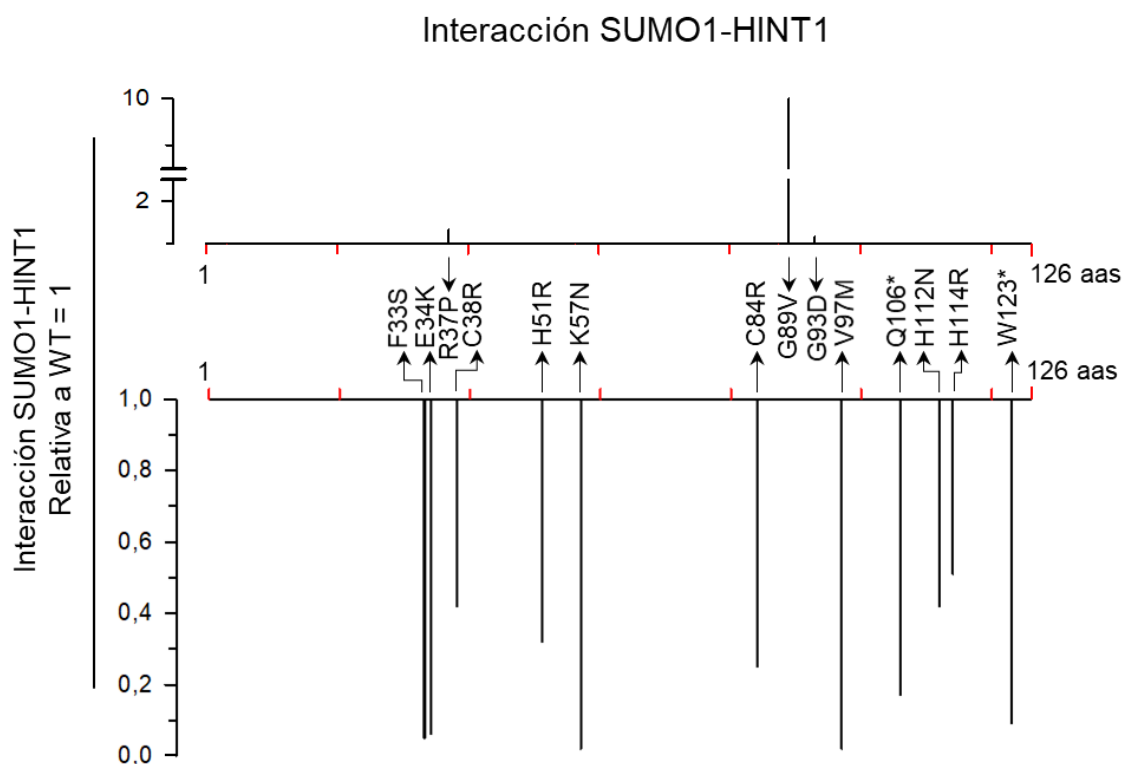


Figura 54. Nivel de asociación de los mutantes humanos de la HINT1 con el SUMO1. En los ensayos de interacción *in vitro* se incubó la agarosa-SUMO1 (100 nM) con 200 nM de la HINT1 WT o de la mutación correspondiente en presencia de 2,5 mM CaCl₂. Los datos de las interacciones de los diferentes mutantes de la HINT1 con el SUMO1 están referidos al dato obtenido con la HINT1 WT, al que se le ha dado el valor arbitrario de 1. Los datos fueron analizados por ANOVA seguido del test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; $p < 0,05$.

Como hemos descrito anteriormente, la actividad SUMO proteasa de la HINT1 se estimula por Ca²⁺-CaM o NO. Asimismo, nuestros resultados han mostrado que la HINT1

une CaM por su extremo amino terminal, y que la mutación HINT1 T17A abole esta unión (Figura 32). El estudio de interacción de las distintas mutaciones humanas de la HINT1 con la CaM desveló que la mayoría de estos mutantes interaccionan débilmente con la CaM (Figura 55).

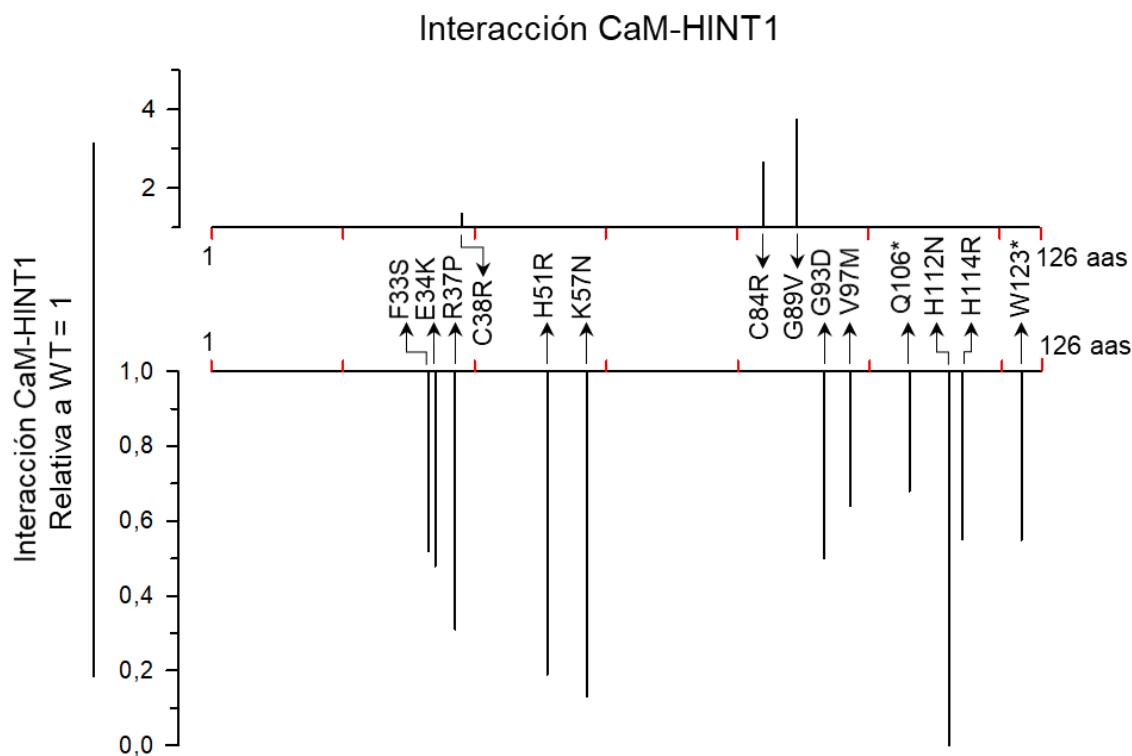


Figura 55. Asociación de los mutantes humanos de la HINT1 con la CaM. En los ensayos de interacción *in vitro* se incubó la agarosa-CaM (100 nM) con 200 nM de la HINT1 WT o del mutante correspondiente en presencia de 2,5 mM CaCl₂. Los datos de las interacciones de los diferentes mutantes de la HINT1 con la CaM están referidos al dato obtenido con la HINT1 WT, al que se le ha dado el valor arbitrario de 1. Los datos fueron analizados por ANOVA seguido del test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; $p < 0,05$.

3.4. Unión a la NR1 y al MOR de los mutantes humanos de la HINT1

Estudios previos han descrito la interacción de la HINT1 con el dominio citosólico C1 de la subunidad NR1 del receptor de NMDA (Rodríguez-Muñoz y col., 2015a). Sin embargo, observamos que las mutaciones de la HINT1 causantes de la ARAN-NM se unen más débilmente con la subunidad NR1, excepto C38R y G89V, que parecen fortalecer su asociación con esta proteína (Figura 56A).

Otro receptor de la membrana plasmática con el que la HINT1 interacciona es el MOR. Mediante el uso de péptidos solapantes en ensayos *pull-down* se ha determinado que la HINT1 se une a la secuencia TSST (354-357 aminoácidos) del este GPCR,

localizada en su cola C-terminal citosólica (Rodríguez-Muñoz y col., 2011a). De manera similar a lo observado para la NR1, todos los mutantes de la HINT1, salvo G89V, se asociaron débilmente con el MOR (Figura 56B).

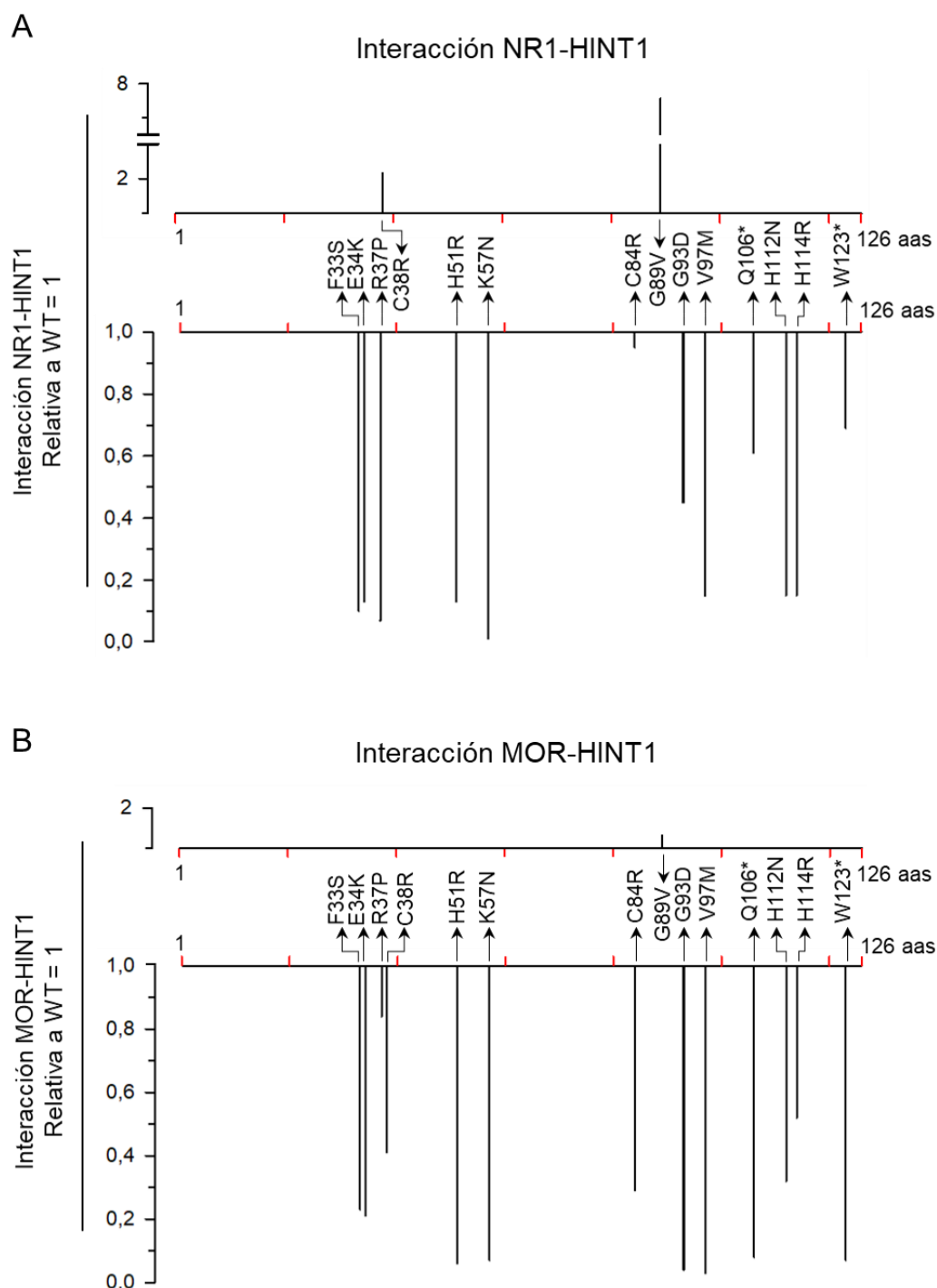


Figura 56. Asociación de los mutantes humanos de la HINT1 con la NR1 y el MOR Ct. En los ensayos de interacción *in vitro* se incubó la agarosa-GST-NR1 (A) o la agarosa-MOR (B) (100 nM) con 200 nM de la HINT1 WT o del mutante correspondiente en presencia de 2,5 mM CaCl₂. Los datos de las interacciones de los diferentes mutantes de la HINT1 con la NR1 o el MOR están referidos al dato obtenido con la HINT1 WT, al que se le ha dado el valor arbitrario de 1. Los datos fueron analizados por ANOVA seguido del test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; $p < 0,05$.

3.5. Unión a la RGSZ2 y al ICD de la teneurina 1 de los mutantes de la HINT1 causantes de la ARAN-NM

La HINT1 actúa de puente entre el MOR y la RGSZ2 cuando ésta última está unida a la nNOS (Rodríguez-Muñoz y col., 2013). La RGSZ2 es un sustrato sumoilado sobre el que la HINT1 actúa, y hemos confirmado mediante ensayos *in vitro* la interacción directa entre ambas proteínas. El patrón de asociación de los mutantes humanos de la HINT1 con la RGSZ2 fue dispar. Mientras algunos establecieron uniones muy estables, como C38R, G89V, etc., las asociaciones de otros mutantes (R37P, V97M, etc.) fueron mucho más débiles (Figura 57).

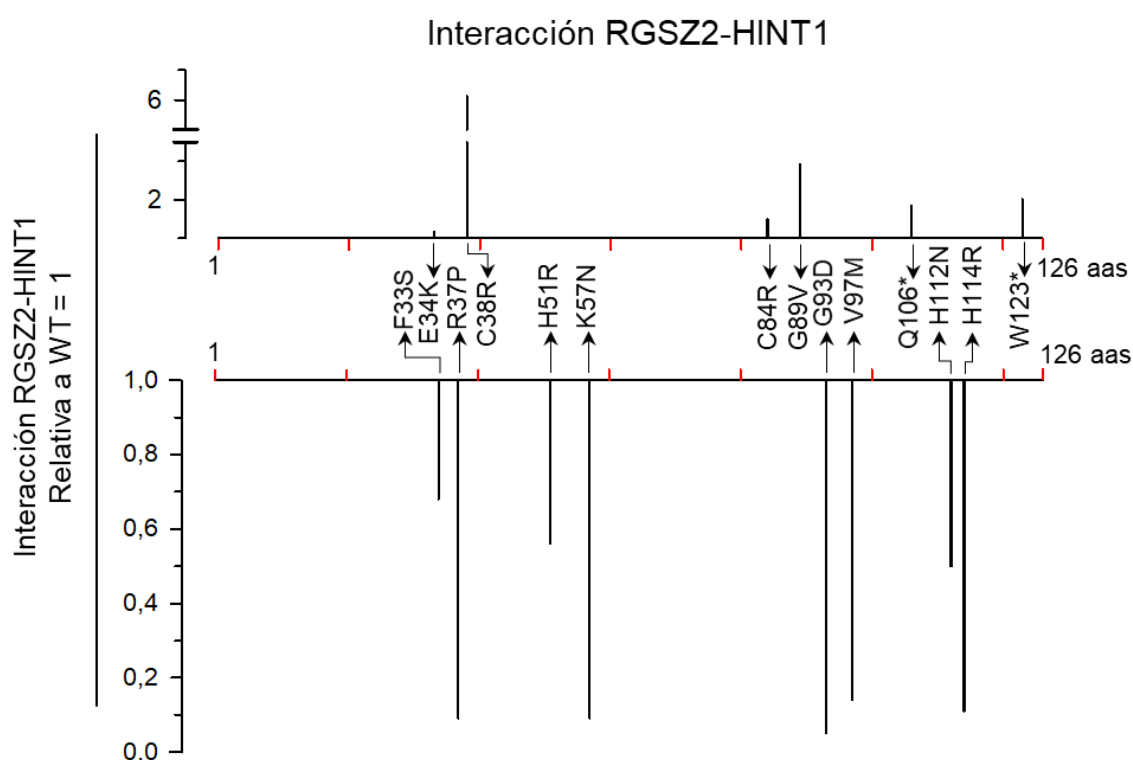


Figura 57. Asociación de los mutantes humanos de la HINT1 con la RGSZ2. En los ensayos de interacción *in vitro* se incubó la agarosa-RGSZ2 (100 nM) con 200 nM de la HINT1 WT o de la mutación correspondiente en presencia de 2,5 mM CaCl₂. Los datos de las interacciones de los diferentes mutantes de la HINT1 con la RGSZ2 están referidos al dato obtenido con la HINT1 WT, al que se le ha dado el valor arbitrario de 1. Los datos fueron analizados por ANOVA seguido del test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; $p < 0,05$.

A nivel del núcleo, la HINT1 interacciona con diferentes factores de transcripción, entre los que se encuentra el dominio intracelular de la teneurina 1 (Schöler y col., 2015). Los ensayos de interacción *in vitro* de los diferentes mutantes de la HINT1 responsables de la ARAN-NM revelaron que la mayoría de estas mutaciones reducen

significativamente la formación de complejos HINT1-ICD de la teneurina 1. Únicamente los mutantes C84R and G89V presentaron un comportamiento diferente, uniéndose más intensamente que la HINT1 WT a este factor de transcripción (Figura 58).

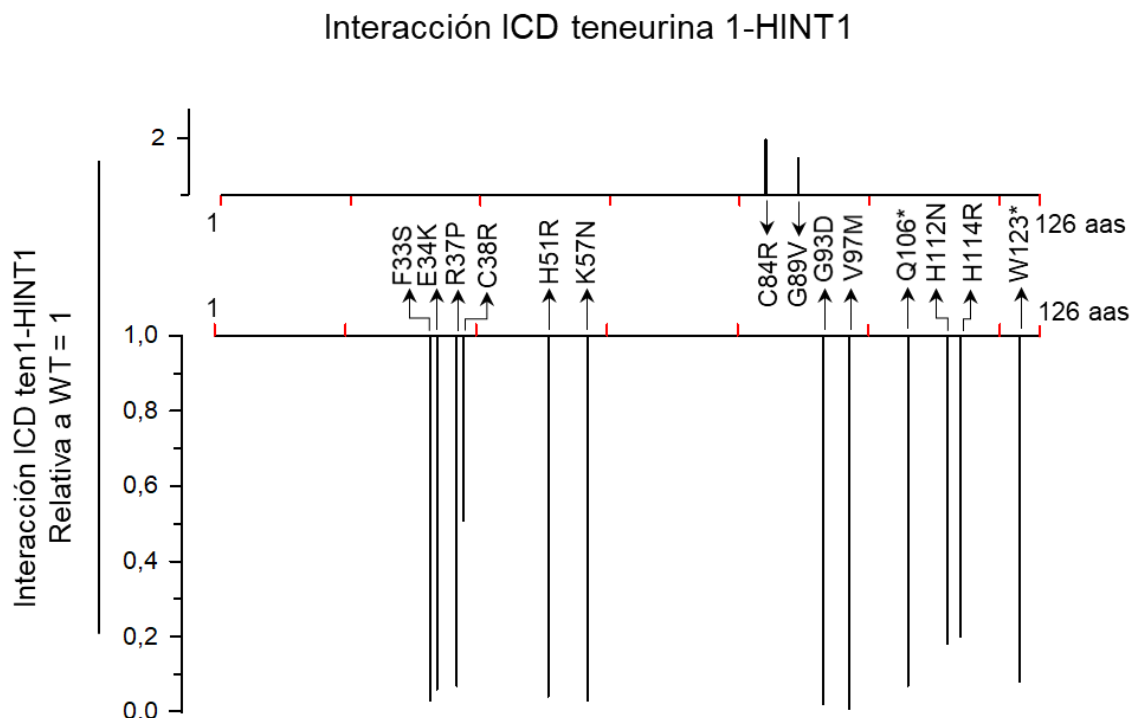


Figura 58. Asociación de los mutantes humanos de la HINT1 con el ICD de la teneurina 1. En los ensayos de interacción *in vitro* se incubó la agarosa-ICD de la teneurina (100 nM) con 200 nM de la HINT1 WT o de la mutación correspondiente en presencia de 2,5 mM CaCl₂. Los datos de las interacciones de los diferentes mutantes de la HINT1 con el ICD de la teneurina 1 están referidos al dato obtenido con la HINT1 WT, al que se le ha dado el valor arbitrario de 1. Los datos fueron analizados por ANOVA seguido del test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; $p < 0,05$.

3.6. Unión al σ 1R de los mutantes de la HINT1 causantes de la ARAN-NM

El tándem integrado por la HINT1 y el σ 1R es esencial para conectar los GPCRs, como el MOR, con el NMDAR. Sin embargo, la asociación HINT1- σ 1R es débil (Rodríguez-Muñoz y col., 2015b). De forma similar a lo observado para las proteínas previas incluidas en el estudio, la mayoría de los mutantes humanos de la HINT1 apenas establecieron uniones estables con el σ 1R. Como excepción, destacaron C38R y G89V, que mantuvieron unos niveles de asociación con el σ 1R equiparables a los de la HINT1 WT (Figura 59).

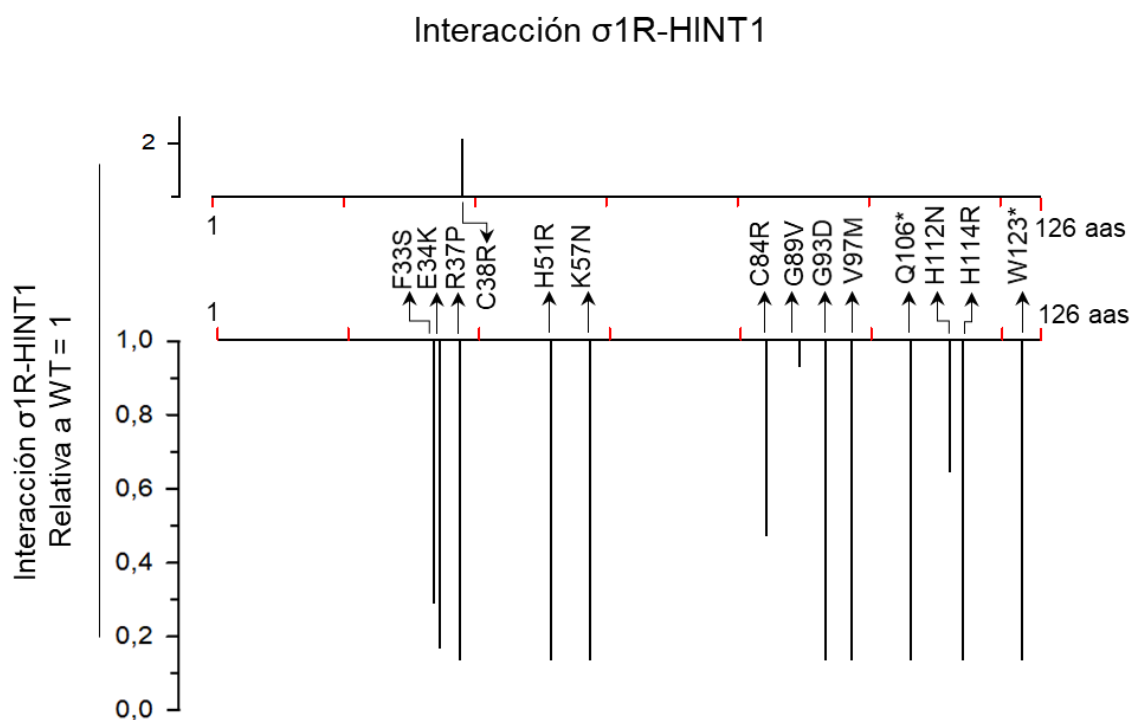


Figura 59. Interacción de los mutantes humanos de la HINT1 con el σ 1R. En los ensayos de interacción *in vitro* se incubó la agarosa- σ 1R (100 nM) con 200 nM de la HINT1 WT o del mutante correspondiente en presencia de 2,5 mM CaCl_2 . Los datos de las interacciones de los diferentes mutantes de la HINT1 con el σ 1R están referidos al dato obtenido con la HINT1 WT, al que se le ha dado el valor arbitrario de 1. Los datos fueron analizados por ANOVA seguido del test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; $p < 0,05$.

En resumen, la actividad SUMO proteasa estaba abolida en muchos de estos mutantes humanos de la HINT1 responsables de la ARAN-NM y presente, pero desregulada, en unos pocos. Además, estos mutantes humanos de la HINT1 exhibieron un patrón alterado de asociaciones con las diferentes proteínas de señalización del estudio. No obstante, las diferentes mutaciones provocaron, en general, una menor capacidad de la HINT1 para establecer complejos proteicos.

4. Unión de HINT1, σ 1R y CaM a las regiones citosólicas de los TRPs

4.1. Interacciones del TRPV1

El canal TRPV1 humano tiene un largo extremo amino terminal de 433 aminoácidos, mientras que el extremo carboxilo se extiende desde el residuo 680 al 839 (Figura 60). De acuerdo con lo que se ha descrito previamente (Numazaki y col., 2003; Rosenbaum y col., 2004), el análisis de la secuencia proteica mediante *Novafold* indicó la presencia de sitios

de unión para la CaM. En la región amino (175-218 aminoácidos) y en el extremo carboxilo terminal (711 al 730 y del 776 al 794), se localizan los sitios de unión de la CaM.

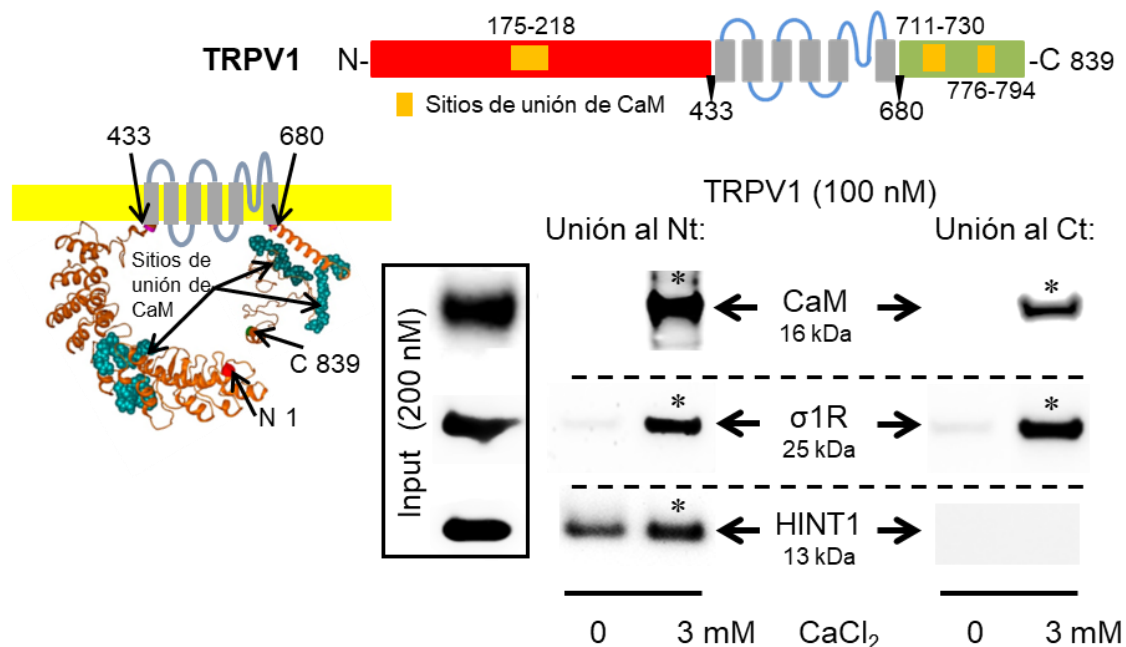


Figura 60. Unión de CaM, σ 1R y HINT1 al receptor TRPV1. Los modelos estructurales del TRPV1 se han obtenido mediante *Novafold*. Modelo lineal: los extremos amino (N) y carboxilo (C) se marcan en rojo y verde, respectivamente, y los seis segmentos transmembrana en gris. Modelo de cintas: se muestra la estructura 3D de las secuencias N- y C-terminales, y los sitios de unión de la CaM se indican con esferas azules. Las interacciones *in vitro* de la CaM, del σ 1R y de la HINT1 con el TRPV1 se evaluaron mediante ensayos de co-precipitación. Las regiones N- y C-terminales (Nt y Ct) del TRPV1 (100 nM) se co-incubaron con 200 nM de la CaM, del σ 1R o de la HINT1 en ausencia o presencia de 3 mM de CaCl_2 . Tras la incubación, las proteínas unidas al TRPV1 fueron separadas y analizadas por *western-blot*. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control. Test ANOVA y comparaciones múltiples de Dunnet *versus* grupo control; $p < 0,05$.

Mediante ensayos *in vitro* estudiamos la asociación de las regiones citosólicas amino y carboxilo terminales del TRPV1, que se mantuvieron unidas covalentemente a la NHS-agarosa, con las proteínas recombinantes CaM, σ 1R y HINT1 (Figura 60). Tras una co-incubación de 30 minutos en agitación a temperatura ambiente, se eliminó la proteína correspondiente no unida a la agarosa-TRPV1. Finalmente, la proteína que se mantuvo asociada se separó de la agarosa-TRPV1 mediante solubilización con el tampón *Laemmli* 2X calentado a 100 °C y posterior filtración, y se analizó por *western-blot*. Así, se observó que las asociaciones de la CaM y el σ 1R con el N-terminal del TRPV1 son fuertemente dependientes de calcio, mientras que la interacción de la HINT1 lo es en

menor medida, aunque sí aumenta ligeramente en presencia de 3 mM de CaCl_2 . Por el contrario, la HINT1 no se unió a la región carboxilo terminal del canal, pero la CaM y el $\sigma 1\text{R}$ exhibieron un patrón similar de comportamiento en ambos extremos del TRPV1 (Figura 60).

A continuación, analizamos si los sitios de unión de las tres proteínas de señalización seleccionadas coinciden sobre la secuencia del TRPV1, de forma que la asociación de una de ellas dificultase o previniese la de alguna de las otras. Para ello se realizaron ensayos de competición en los que se co-incubó una concentración constante de la agarosa-TRPV1 con la HINT1 o la CaM y concentraciones crecientes del $\sigma 1\text{R}$. De este modo, se obtuvo que la unión del $\sigma 1\text{R}$ no reduce la asociación de la HINT1 al canal, pero sí obstaculiza la interacción de la CaM tanto con la región N-terminal como C-terminal del TRPV1 (Figuras 61A y B).

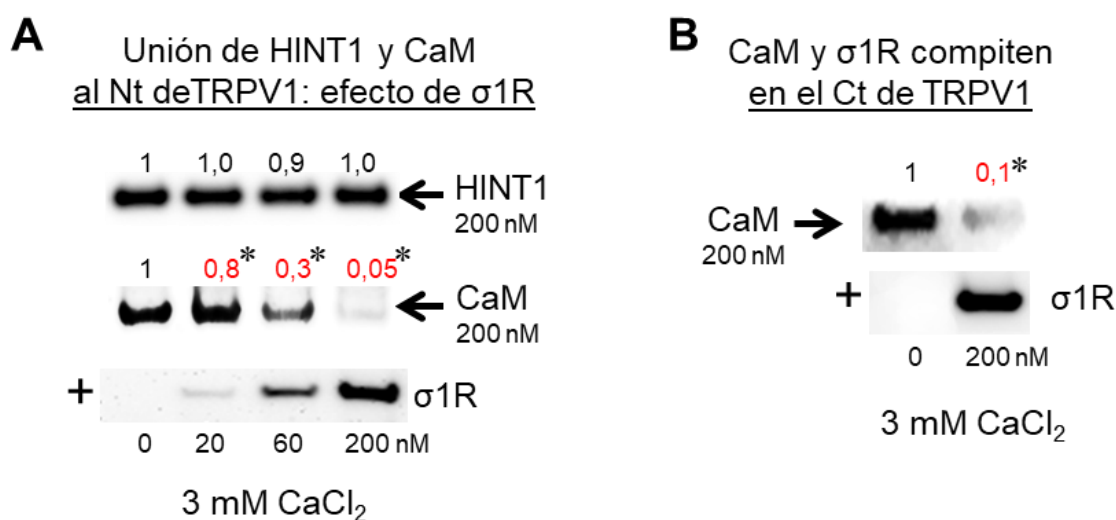


Figura 61. Competición entre el $\sigma 1\text{R}$ y la HINT1 o la CaM para unirse a las regiones N- y C-terminales del TRPV1. (A y B) El N- o C-terminal (Nt y Ct, respectivamente) del TRPV1 se incubaron con una concentración constante de la HINT1 o la CaM y cantidades crecientes del $\sigma 1\text{R}$ en presencia de 3 mM de CaCl_2 . “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control. Test ANOVA y comparaciones múltiples de Dunnet *versus* grupo control; $p < 0,05$.

4.2. Interacciones del TRPA1

El receptor TRPA1 se caracteriza por poseer el extremo amino terminal más extenso de todos los miembros de la familia TRP, con 721 aminoácidos, mientras que el C terminal se extiende desde el aminoácido 961 al 1125. En la secuencia 581-600 del N-terminal se localizó un sitio de unión de la CaM. El programa informático *Novafold*

también indicó otro posible sitio de interacción de la CaM (992-1011) en el extremo carboxilo terminal (Figura 62). De hecho, en estudios previos han sugerido la unión de la CaM a una región del extremo C-terminal del TRPA1 y que, al mutarse, abole el efecto del calcio sobre dicho canal (Cordero-Morales y col., 2011; Hasan y col., 2017).

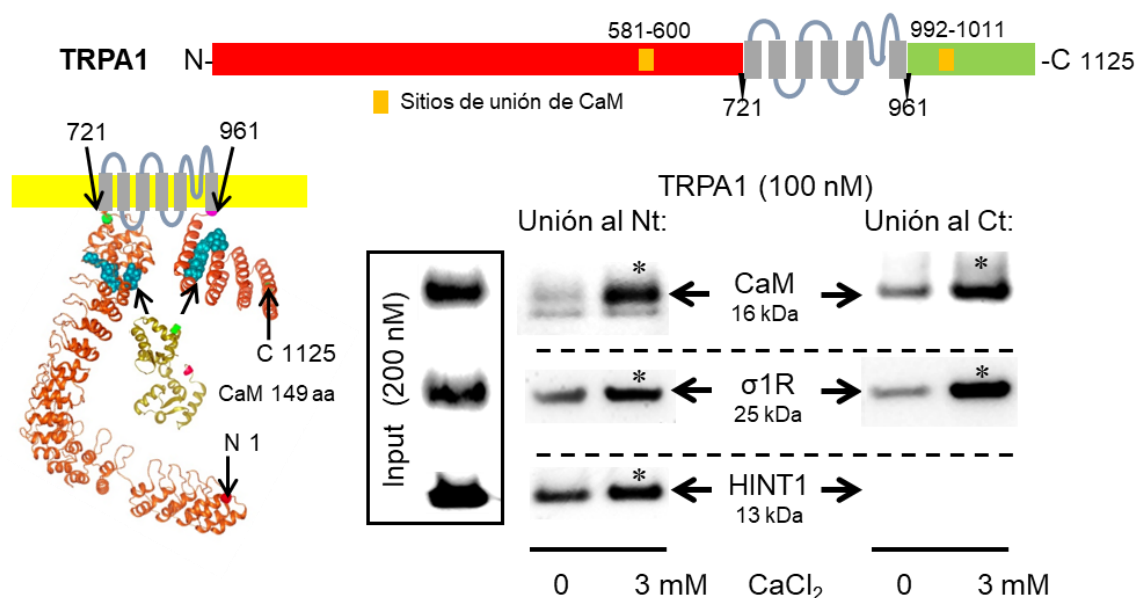


Figura 62. Unión de la CaM, el σ 1R y la HINT1 al TRPA1. Los modelos estructurales del TRPA1 se han generado con *Novafold*. Modelo lineal: los extremos amino (N) y carboxilo (C) se marcan en rojo y verde, respectivamente, y los seis segmentos transmembrana en gris. Modelo de cintas: se muestra la estructura 3D de las secuencias N- y C-terminales, los sitios de unión de la CaM se indican con esferas azules y la propia CaM se representa en amarillo. Las interacciones *in vitro* de la CaM, el σ 1R y la HINT1 con el TRPA1 se evaluaron mediante ensayos de co-precipitación. Las regiones N- y C-terminales (Nt y Ct) del TRPA1 (100 nM) se co-incubaron con 200 nM de la CaM, del σ 1R o de la HINT1 en ausencia o presencia de 3 mM de CaCl_2 . Tras la incubación, las proteínas unidas al TRPA1 fueron separadas y analizadas por *western-blot*. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control. Test ANOVA y comparaciones múltiples de Dunnet *versus* grupo control; $p < 0,05$.

De manera similar al análisis realizado para el TRPV1, se examinó la interacción de la CaM, el σ 1R y la HINT1 con los extremos terminales del TRPA1. Los resultados de nuestros ensayos *in vitro* confirmaron que la CaM se une de forma estable con ambos extremos Nt y Ct del TRPA1, siendo la asociación con el extremo carboxilo menos dependiente de calcio que la establecida con el amino terminal. De modo similar, el σ 1R interactuó con ambas regiones citosólicas del canal, siendo el calcio un potenciador de su unión. Por el contrario, la HINT1 se asoció únicamente con el extremo amino terminal del TRPA1, lo que depende moderadamente de la concentración de calcio (Figura 62).

Los ensayos de competición realizados sobre el TRPA1 mostraron que el σ 1R previene la unión de la HINT1 al canal. Tanto la CaM como el σ 1R se asociaron a ambas regiones citosólicas del receptor, pero sólo compitieron en la unión al extremo amino terminal, donde la mínima presencia del σ 1R ya redujo a más de la mitad la unión de la CaM al TRPA1. Por el contrario, el σ 1R potenció sustancialmente la interacción de la CaM con el C-terminal del TRPA1 (Figura 63).

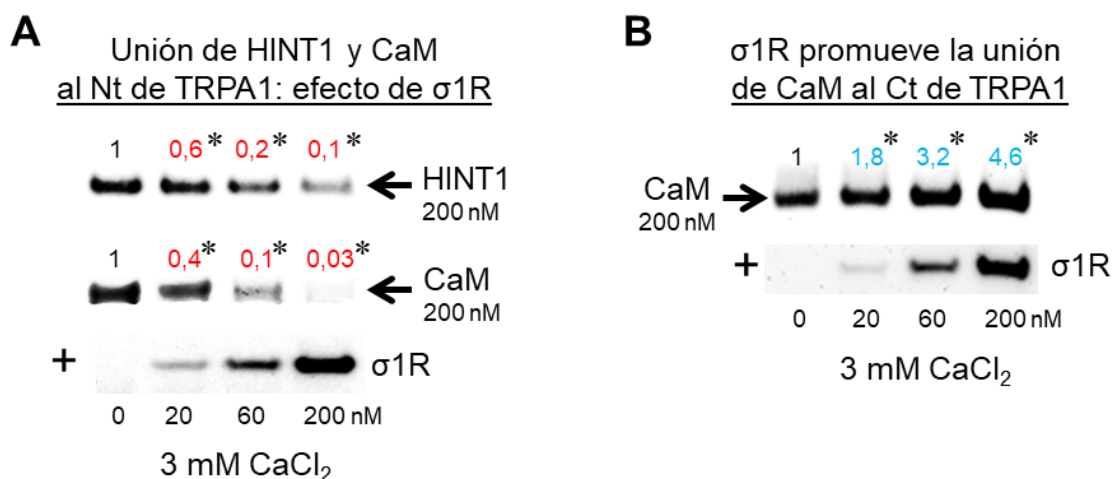


Figura 63. Competición entre el σ 1R y la HINT1 o la CaM para unirse a las regiones N- y C-terminales del TRPA1. (A y B) El N- o C-terminal (Nt y Ct, respectivamente) del TRPA1 se incubaron con una concentración constante de la HINT1 o la CaM y cantidades crecientes del σ 1R en presencia de 3 mM de CaCl₂. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control. Test ANOVA y comparaciones múltiples de Dunnet *versus* grupo control; $p < 0,05$.

4.3. Interacciones del TRPM8

El canal TRPM8 posee un extremo N-terminal de 639 aminoácidos donde el programa *Novafold* señaló un sitio de unión para la CaM, concretamente en la región 564-585, aunque ningún estudio previo ha descrito la asociación TRPM8-CaM. Por otro lado, el dominio carboxilo terminal no presenta ninguna zona de interacción con la CaM, y por este motivo dicha región no se clonó.

Los ensayos de interacción *in vitro* mostraron que las tres proteínas del estudio, la CaM, el σ 1R y la HINT1 se asocian al dominio amino del TRPM8. La formación de los complejos HINT1-TRPM8 depende débilmente de calcio, mientras que la unión de la CaM y del σ 1R es muy dependiente, siendo casi indetectable cuando no hay CaCl₂ en el medio (Figura 64).

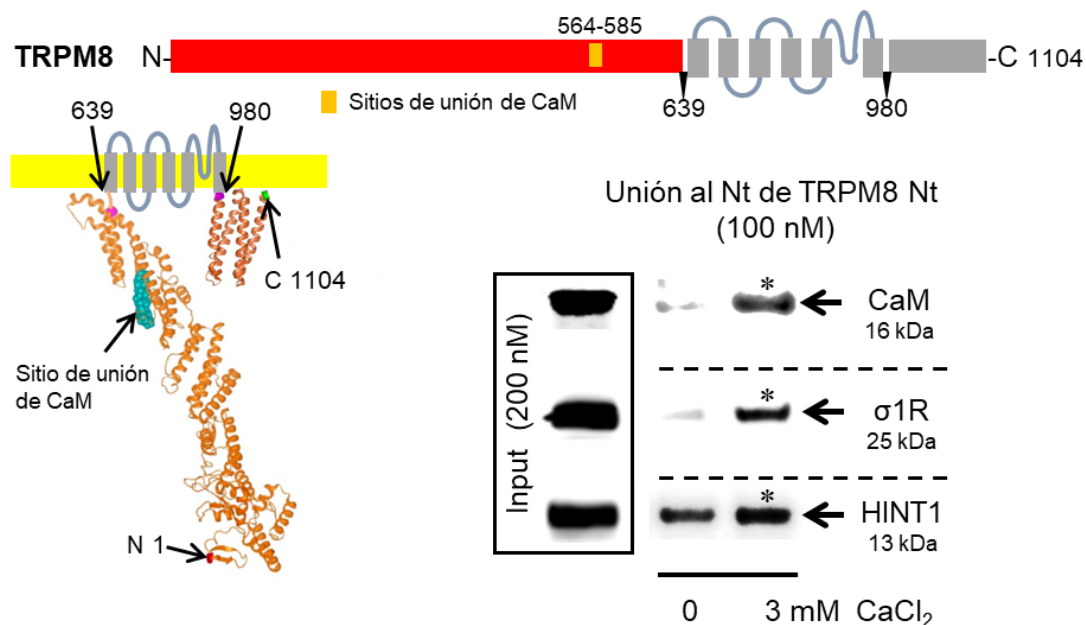


Figura 64. Unión de la CaM, el σ 1R y la HINT1 al TRPM8. Los modelos estructurales del TRPM8 se han obtenido mediante *Novafold*. Modelo lineal: el extremo amino (N) se marca en rojo. Modelo de cintas: se muestra la estructura 3D de las secuencias N- y C-terminales, y los sitios de unión de la CaM se indican con esferas azules. Las interacciones *in vitro* de la CaM, el σ 1R y la HINT1 con el TRPM8 se evaluaron mediante ensayos de co-precipitación. La región N-terminal (Nt) del TRPM8 (100 nM) se co-incubó con 200 nM de la CaM, del σ 1R o de la HINT1 en ausencia o presencia de 3 mM de CaCl_2 . Tras la incubación, las proteínas unidas al TRPM8 fueron separadas y analizadas por *western-blot*. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control. Test ANOVA y comparaciones múltiples de Dunnet *versus* grupo control; $p < 0,05$.

Los ensayos de competición entre una concentración constante de la HINT1 o de la CaM y concentraciones crecientes del σ 1R sobre la agarosa-TRPM8 Nt mostraron que la presencia del σ 1R no altera la unión de la HINT1 con el canal. Sin embargo, la interacción de la CaM con el extremo amino del TRPM8 se redujo ante una concentración equivalente del σ 1R en el medio (Figura 65). En consecuencia, la HINT1 y el σ 1R pueden coexistir unidos al TRPM8, mientras que la presencia del σ 1R impide la unión de la CaM.

En resumen, la HINT1 únicamente se unió a los extremos amino terminales de los TRPs elegidos, y sus interacciones fueron poco dependientes de calcio. Por el contrario, las asociaciones del σ 1R y de la CaM con los TRPs dependieron más de los niveles de calcio presentes en el medio. Las competiciones entre las 3 proteínas del estudio por unirse a los TRPs mostraron un patrón diverso que varió en función del TRP y del extremo citosólico analizado.

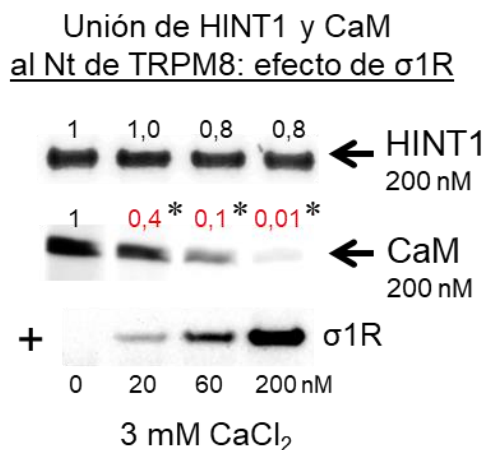


Figura 65. Competencia entre el σ 1R y la HINT1 o la CaM para unirse a la región N-terminal del TRPM8. El N-terminal (Nt) del TRPM8 se incubó con una concentración constante de la HINT1 o la CaM y cantidades crecientes del σ 1R en presencia de 3 mM de CaCl₂. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control. Test ANOVA y comparaciones múltiples de Dunnet *versus* grupo control; $p < 0,05$.

4.4. Efecto de los ligandos del σ 1R en sus interacciones con los TRPs seleccionados

Con el fin de analizar el efecto de los ligandos del σ 1R en las interacciones σ 1R-TRPs primero se realizó una incubación del σ 1R con la agarosa-TRP correspondiente durante 30 minutos en agitación a RT. A continuación, se eliminó el σ 1R no unido a la agarosa y se llevó a cabo una segunda incubación similar a la primera en la que se añadieron concentraciones crecientes del ligando de interés. Después, descartamos el ligando y el posible σ 1R que se hubieran separado de la agarosa. Finalmente, el σ 1R que permanecía unido a la agarosa-TRP se separó mediante el tampón *Laemmli* 2X calentado a 100 °C para su análisis por *western-blot*.

Por comparación con los estudios de regulación de receptores de membrana plasmática, en este ámbito nos referimos a los ligandos del σ 1R como agonistas y antagonistas en función de sus efectos en los ensayos de analgesia de morfina en roedores (Mei y Pasternak, 2002). En ellos, los agonistas del σ 1R reducen el efecto antinociceptivo de la morfina, mientras que los antagonistas potencian la analgesia de este opioide.

En presencia de 3 mM de CaCl₂, el neuroesteroide pregnenolona sulfato, un agonista del σ 1R, bloqueó las interacciones de este receptor con los dominios amino y carboxilo terminales del TRPA1 (Figura 66). Por el contrario, el antagonista progesterona potenció la unión del σ 1R con la región N-terminal del TRPA1, pero debilitó su interacción con el C-terminal de dicho canal. Respecto al TRPV1 y el TRPM8, la pregnenolona sulfato también minimizó la unión del σ 1R con el dominio N-terminal del TRPV1, pero incrementó sustancialmente la asociación del σ 1R con las regiones carboxilo del TRPV1 y amino del TRPM8. Sin embargo, la progesterona redujo significativamente las uniones

del σ 1R con las secuencias C-terminal del TRPV1 y N-terminal del TRPM8, mientras que no modificó la asociación σ 1R-extremo amino del TRPV1 (Figura 66).

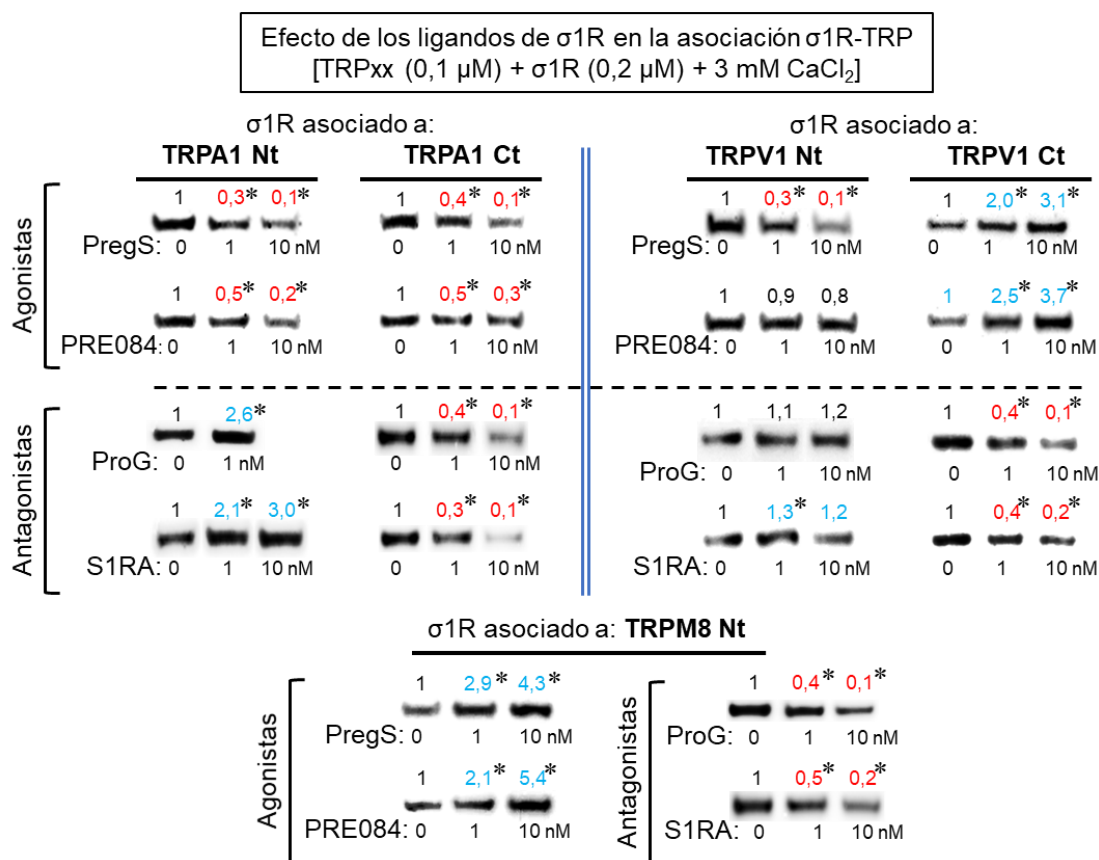


Figura 66. Efecto de los ligandos del σ 1R en las interacciones σ 1R-TRP. Los TRPs acoplados a agarosa se incubaron con el σ 1R y los complejos agarosa-TRP- σ 1R se separaron del σ 1R libre mediante 3 ciclos de lavado/resuspensión. A continuación, los complejos agarosa-TRP- σ 1R se incubaron 30 minutos en agitación en presencia de concentraciones crecientes de los ligandos del σ 1R. Finalmente, la fracción del σ 1R que se mantuvo unida a los TRPs se separó por solubilización para su análisis por *western-blot*. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control. Test ANOVA y comparaciones múltiples de Dunnet *versus* grupo control; $p < 0,05$. PregS: pregnenolona sulfato; ProG: progesterona.

El efecto de estos neuroesteroides en las interacciones del σ 1R con los TRPs se reprodujo casi en su totalidad por los ligandos exógenos del σ 1R. De este modo, el antagonista selectivo S1RA moduló estas asociaciones de manera similar a la pregnenolona, y exceptuando en el dominio amino terminal del TRPV1, el agonista PRE084 imitó los efectos de la pregnenolona sulfato (Figura 66). En esta región N-terminal del TRPV1, el PRE084 apenas modificó la unión σ 1R-TRPV1, mientras que la pregnenolona sulfato minimizó esta interacción.

5. Asociación del TRPA1 con el MOR y el NMDAR: papel de la CaM

5.1. Asociación del TRPA1 con el MOR y la subunidad NR1 del NMDAR en diferentes estructuras del SN: efecto de intervenciones farmacológicas

Nuestros resultados confirmaron la presencia del canal TRPA1 en la corteza cerebral, la médula espinal y los DRG de ratón, tal y como han descrito varios estudios en diferentes estructuras del sistema nervioso murino (Story y col., 2003; Nagata y col., 2005; Kunert-Keil y col., 2006; Dai y col., 2007; Kim y col., 2010; Maqboul y Elsadek, 2017). El monómero de TRPA1, constituido por 1125 aminoácidos, se inmunodetectó en las fracciones enriquecidas en sinaptosomas empleando un anticuerpo dirigido contra la región amino terminal del canal (Figura 67A).

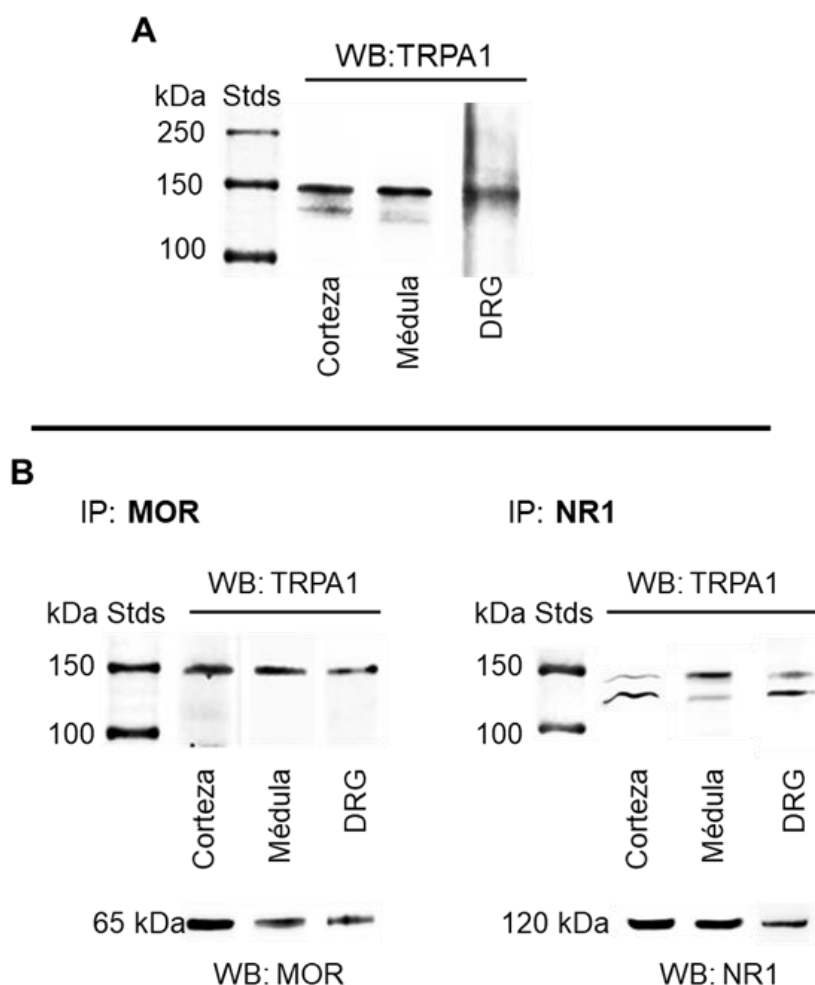


Figura 67. Expresión del TRPA1 en varias estructuras cerebrales y su asociación con el MOR y la subunidad NR1 del NMDAR. (A) Inmunodetección del monómero TRPA1 en fracciones sinaptosomales de la corteza cerebral, médula espinal y DRG. (B) Se solubilizaron las fracciones P2 y se inmunoprecipitó al MOR y a la subunidad NR1 del NMDAR. La coprecipitación del TRPA1 se detectó por *western-blot* con un anticuerpo dirigido contra su dominio amino terminal. IP: inmunoprecipitación; WB: *western-blot*.

El MOR está presente en la corteza y en la sustancia gelatinosa del asta dorsal de la médula espinal, así como en los somas de las neuronas sensoriales (localizados en los DRG) desde donde el MOR se transporta hacia los terminales centrales y periféricos (Coggeshall y col., 1997; Truong y col., 2003). Para estudiar la posible asociación del TRPA1 con el MOR, se inmunoprecipitó al receptor G en las membranas sinaptosomales de corteza cerebral, médula espinal y DRG, regiones cerebrales donde coexisten ambos receptores. Se obtuvo que el TRPA1 acompaña al MOR inmunoprecipitado en estas tres estructuras nerviosas, lo que sugiere que ambos receptores forman complejos funcionales en el sistema nervioso (Figura 67B).

De forma análoga, se exploró la asociación del canal TRP con el receptor ionotrópico de glutamato NMDA, y se detectó que el TRPA1 coprecipita con la subunidad NR1 del NMDAR (Figura 67B). Las inmunoseñales del TRPA1 aparecen habitualmente como un doblete entre 140 y 150 kDa, lo que puede deberse a su glicosilación en dos sitios del bucle extracelular entre las regiones transmembrana 1 y 2 (721-960 aminoácidos) (Egan y col., 2016).

La relevancia funcional de los complejos proteicos se evidencia cuando estas asociaciones entre proteínas responden plásticamente a tratamientos farmacológicos o alteraciones fisiológicas. Por ello, administramos a diferentes grupos de ratones el agonista opioide morfina por vía icv (primer o segundo ventrículo), por vía ip, o el agonista NMDA del NMDAR por vía icv. La morfina se empleó a unas dosis establecidas previamente de 10 nmoles por vía icv y de 10 mg/kg por vía ip, ya que esas dos dosis producen unos niveles similares de analgesia, aproximadamente un 75 % del efecto máximo en el test del *tail-flick*.

La morfina inyectada icv alcanza su pico de efecto analgésico a los 30 minutos, mientras que con la administración ip el efecto analgésico es más estable y el máximo se consigue entre los 30 y los 60 minutos post-inyección (Rodríguez-Muñoz y col., 2012; Cortés-Montero y col., 2020). Basándonos en esto, los ratones tratados con morfina icv se sacrificaron a los 30 minutos y el grupo de morfina ip a los 60 minutos post-inyección. Se extrajeron las estructuras cerebrales pertinentes y se prepararon las fracciones ricas en sinaptosomas, donde se procedió a inmunoprecipitar tanto al MOR como al NMDAR y a estudiar los posibles cambios en la asociación del TRPA1 (Figura 68).

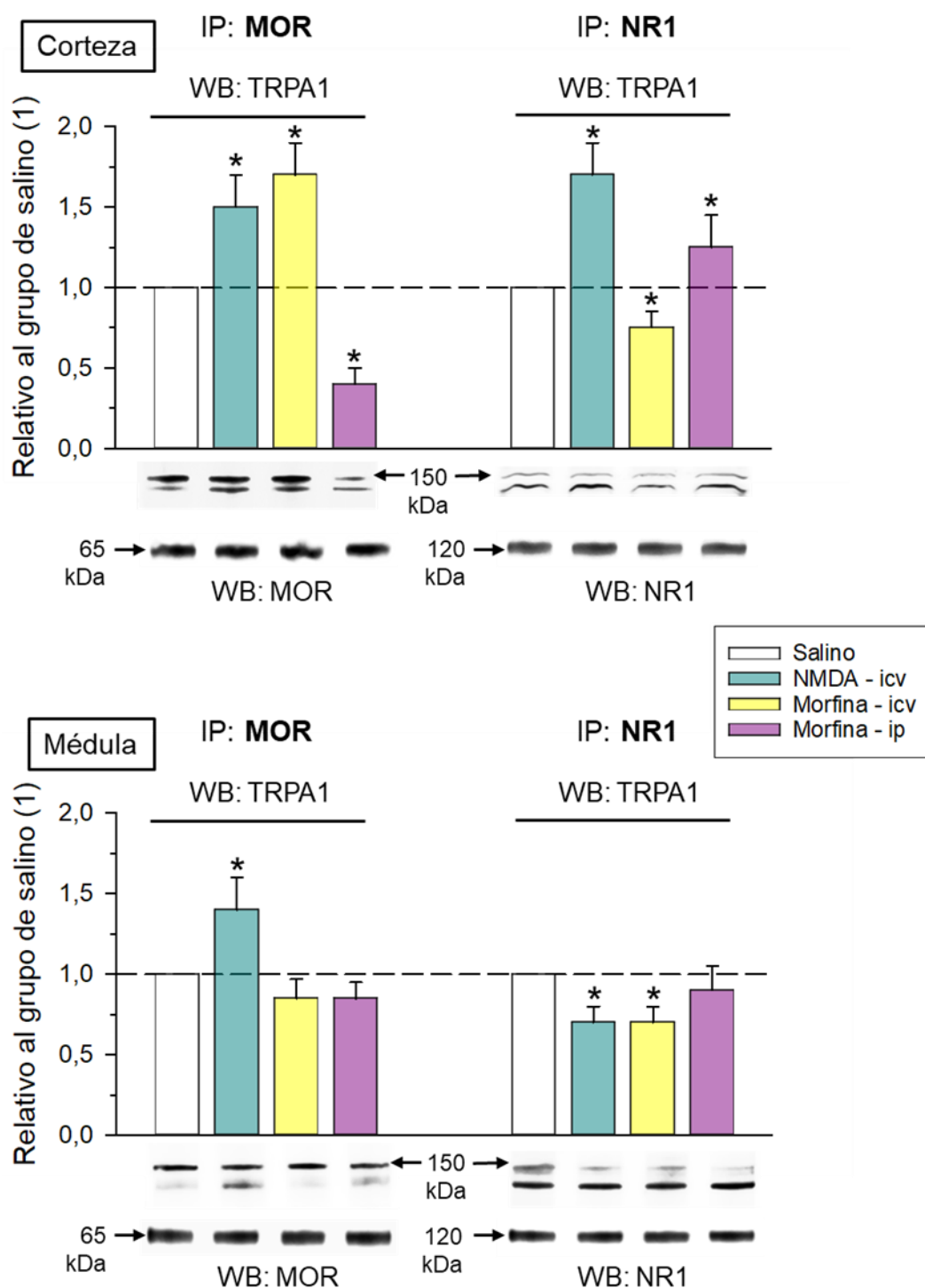


Figura 68. Modulación farmacológica de las asociaciones del TRPA1 con el MOR y la subunidad NR1 del NMDAR. Se trataron diferentes grupos de animales con salino (grupo control), 50 pmoles de NMDA, 10 nmoles de morfina icv y 10 mg/kg de morfina ip. Los ratones administrados por vía icv con NMDA o morfina se sacrificaron a los 30 minutos post-inyección y a los 60 minutos el grupo de morfina vía ip. Se obtuvieron las estructuras nerviosas, se prepararon las fracciones sinaptosomales y se inmunoprecipitó al MOR y a la NR1 del NMDAR. La coprecipitación del TRPA1 se detectó por *western-blot*. A la inmunoseñal correspondiente al grupo de salino (grupo control) se le asignó el valor arbitrario de 1. Los valores corresponden a la media \pm ESM de tres determinaciones con diferentes cohortes de ratones. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control. ANOVA, test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; $p < 0,05$. IP: inmunoprecipitación; WB: *western-blot*.

La administración icv de morfina promovió la coprecipitación del TRPA1 con el MOR en la corteza cerebral, pero debilitó la asociación NR1-TRPA1 tanto en corteza como en médula. La morfina inyectada por vía ip alteró los complejos MOR-TRPA1 y NR1-TRPA1 a nivel cortical, mientras que en médula espinal no provocó cambios (Figura 68).

Por otro lado, es bien conocido que el NMDA administrado por vía icv reduce la analgesia de la morfina inyectada por esa misma ruta (Rodríguez-Muñoz y col., 2012; Cortés-Montero y col., 2020). Los ratones tratados con 50 pmoles de NMDA por vía icv y sacrificados 30 minutos post-inyección mostraron un aumento en las asociaciones MOR-TRPA1 tanto en corteza como en médula. Sin embargo, este compuesto promovió efectos opuestos en la unión del canal TRPA1 al NMDAR en las dos estructuras cerebrales estudiadas: el NMDA indujo un incremento de los complejos TRPA1-NR1 en la corteza y un descenso en la médula espinal (Figura 68).

5.2. El dolor inflamatorio y el neuropático alteran la asociación del TRPA1 con el MOR y el NMDAR

La inyección de formalina en la pata trasera se emplea habitualmente para evaluar el efecto de compuestos analgésicos en la experimentación animal. La administración intraplantar de formalina excita las fibras sensoriales al activar los canales TRPA1. La actividad de estos TRPA1 es la responsable de las respuestas fisiológicas y conductuales asociadas con este modelo de hipersensibilidad dolorosa, que conlleva una sensación de incomodidad en la pata inyectada, que los ratones muerden y lamen profusamente (McNamara y col., 2007; González-Cano y col., 2020).

La inyección intraplantar de 0,5 % de formalina produce una reacción comportamental bifásica: una fase inicial de dolor durante los 5 primeros minutos post-inyección, seguida de un periodo de inactividad y una segunda fase dolorosa que abarca desde los 10 a los 25 minutos post-inyección, aproximadamente (Tejada y col., 2017; Cortés-Montero y col., 2020). Los animales se sacrificaron tras alcanzar el primer pico de hipersensibilidad dolorosa a los 5 minutos tras la inyección de formalina. Se extrajeron los DRG de las vértebras lumbares 3 y 4, así como la sección dorsal de la médula de las regiones vertebrales torácica 13 y lumbar 1, zonas donde se localizan las raíces del nervio ciático y éste se incluye en la masa medular, respectivamente.

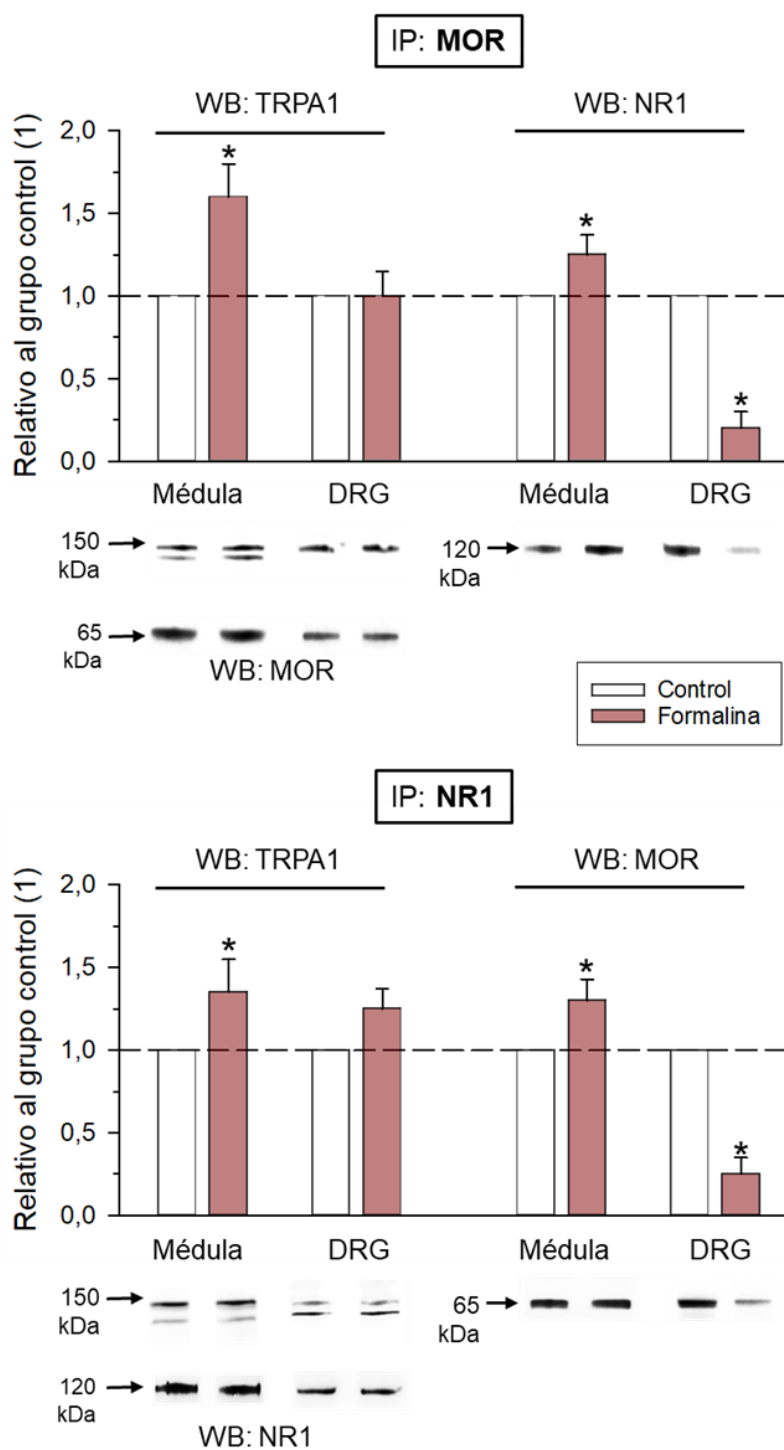


Figura 69. El dolor inducido por la formalina alteró la asociación del TRPA1 con el MOR y el NMDAR. Los animales se sacrificaron 5 minutos post-inyección de formalina por vía intraplantar, cuando se había alcanzado el pico de la primera fase del dolor inducido por este irritante. Se inmunoprecipitó al MOR y a la subunidad NR1 del NMDAR de las fracciones P2 de la médula y los DRG. La coprecipitación del TRPA1 se detectó por *western-blot*. A la inmunoseñal correspondiente del grupo control se le asignó el valor arbitrario de 1. Los valores corresponden a la media \pm ESM de tres determinaciones con diferentes cohortes de ratones. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control. ANOVA, test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; $p < 0,05$. IP: inmunoprecipitación; WB: *western-blot*.

Una vez purificada la fracción rica en sinaptosomas de las estructuras nerviosas extraídas (médula espinal y DRG), analizamos si la activación directa de los canales TRPA1 por la formalina en los terminales periféricos de la pata influencia su asociación con los receptores MOR y NMDA. Asimismo, estudiamos si la administración intraplantar de este irritante afecta a la formación de los complejos MOR-NR1 tanto en la médula espinal como en los ganglios del asta dorsal.

En este escenario, se inmunoprecipitó al MOR y a la subunidad NR1 del NMDAR y se observó que la formalina abole casi completamente la asociación MOR-NR1 en los DRG, pero la potencia en la médula espinal. Por otro lado, la formalina reforzó los complejos del canal TRPA1 con el MOR y la subunidad NR1 en la médula espinal, detectándose una tendencia similar en las asociaciones TRPA1-NR1 de los ganglios (Figura 69).

También se evaluó la influencia del dolor neuropático (crónico) en la asociación de los canales TRPA1 con los receptores MOR y NMDAR. Para ello se empleó un modelo de dolor neuropático basado en la constricción crónica del nervio ciático o CCI, en el cual se realizan dos ligaduras en el nervio ciático antes de su trifurcación (Bennet y Xie, 1998).

El dolor crónico está instaurado completamente a los siete días tras la cirugía, momento en el que los ratones operados manifiestan alodinia en el test de Von Frey (Sánchez-Blázquez y col., 2013; Sánchez-Blázquez y col., 2020; Cortés-Montero y col., 2020). Así, los animales operados y los controles (sham) se sacrificaron una semana después de la cirugía.

Las asociaciones NMDAR-MOR de la corteza cerebral no varían en el modelo CCI (Sánchez-Blázquez y col., 2013) por lo que, en este caso, estudiamos otras áreas cerebrales más implicadas en la modulación del dolor, como el bulbo raquídeo y el PAG. En estas estructuras, así como en la médula espinal, el CCI provocó una reducción muy significativa de las interacciones del canal TRPA1 con el MOR. De forma similar, se observaron un menor número de complejos constituidos por la subunidad NR1 del NMDAR-TRPA1 en la médula espinal de los ratones CCI con respecto a los sham (Figura 70).

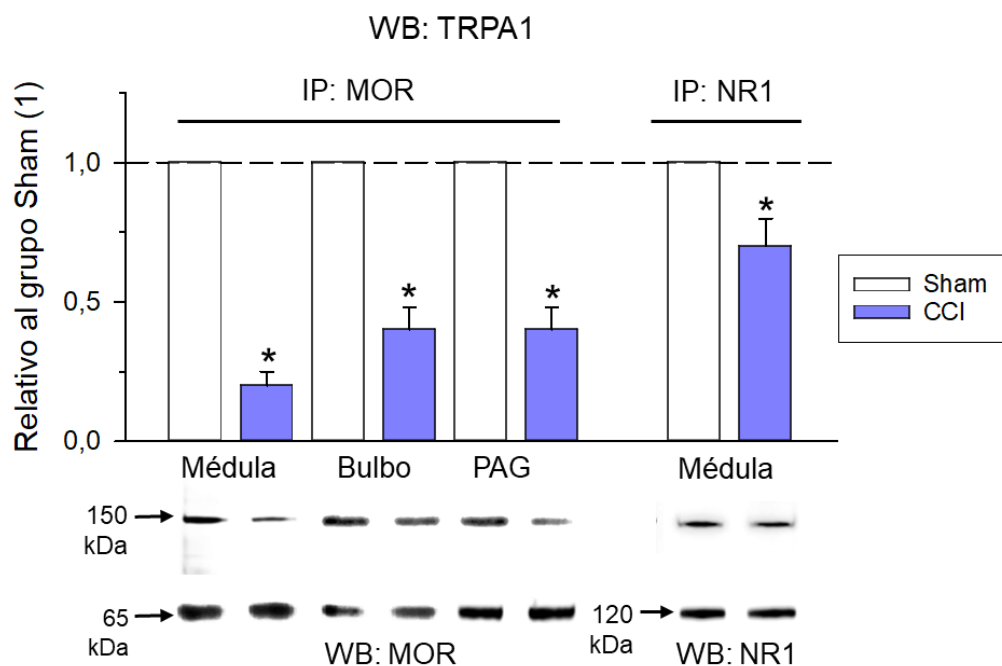


Figura 70. Asociaciones del TRPA1 con el MOR y el NMDAR en el modelo CCI de dolor neuropático. Los animales se sacrificaron 7 días post-cirugía y se obtuvieron las diferentes estructuras nerviosas. Se inmunoprecipitó al MOR y a la subunidad NR1 NMDAR de las fracciones P2. La coprecipitación del TRPA1 se detectó por *western-blot*. A la inmunoseñal correspondiente del grupo sham (control) se le asignó el valor arbitrario de 1. Los valores corresponden a la media \pm ESM de tres determinaciones con diferentes cohortes de ratones. “*” Estadísticamente significativo respecto al grupo control. ANOVA, test Holm-Sidak de comparaciones múltiples; $p < 0,05$. IP: inmunoprecipitación; WB: *western-blot*.

5.3. La CaM media la interacción del canal TRPA1 con el MOR y la subunidad NR1 del NMDAR

Los resultados previos indican que el TRPA1 se asocia con el MOR y con el glutamatérgico NMDA en diferentes estructuras nerviosas. A continuación, y mediante ensayos *pull-down* con proteínas recombinantes, exploramos si estas interacciones entre receptores son directas o están mediadas por una tercera proteína. Los ensayos *in vitro* iniciales mostraron que el MOR no se une directamente a las regiones amino y carboxilo terminales del TRPA1 y que el calcio no potencia esta asociación. Sin embargo, al incubarse previamente cualquiera de las dos regiones citosólicas del TRPA1 con Ca^{2+} -CaM, y después añadir el MOR, entonces sí se observó el acoplamiento del MOR al TRPA1 (Figura 71).

Asociación MOR-TRPA1 (Nt & Ct) mediada por CaM

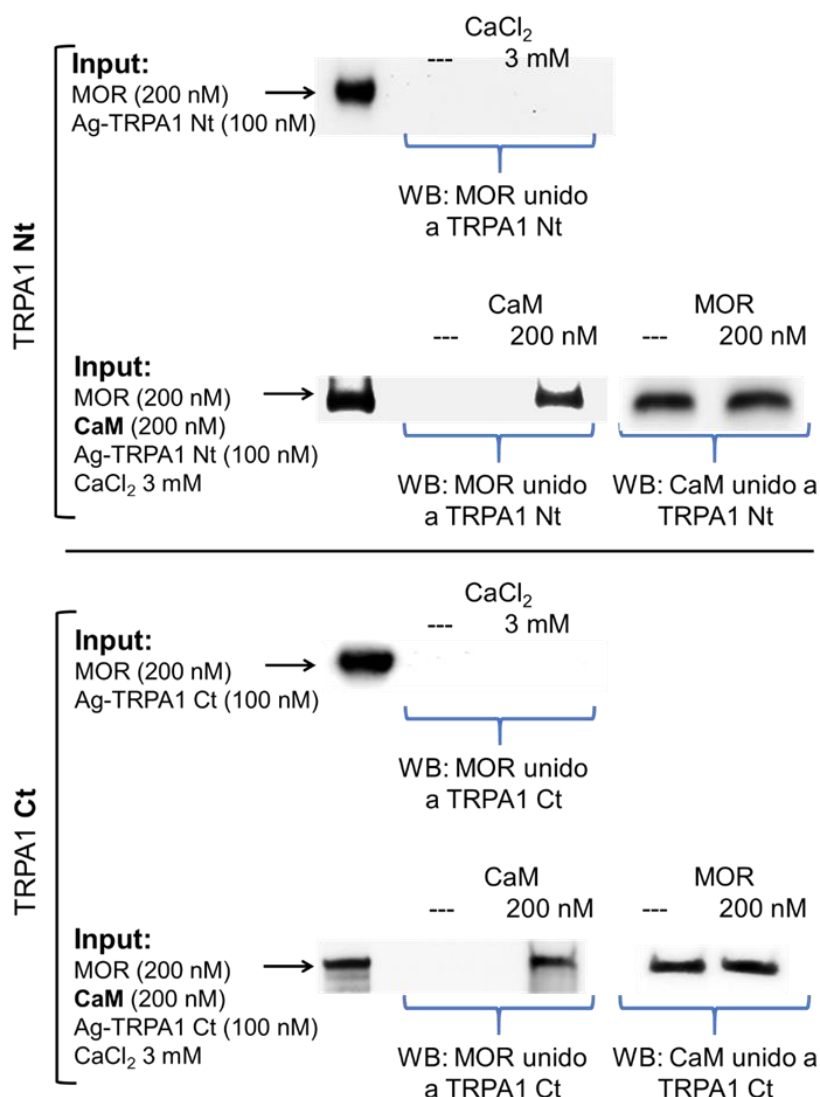


Figura 71. La CaM media la asociación del TRPA1 con el MOR. Las regiones amino y carboxilo terminales (Nt y Ct, respectivamente) del TRPA1 acopladas covalentemente a NHS-agarosa se incubaron con el MOR en ausencia y presencia de 3 mM de CaCl₂. En otros ensayos, las regiones del TRPA1 se incubaron secuencialmente con CaM y después con el MOR en presencia de 3 mM de CaCl₂. Al final de la incubación, se recuperó la agarosa-TRPA1 y se sometió a varios ciclos de lavado-resuspensión y las proteínas unidas al TRPA1 se separaron y se analizaron por *western-blot*. WB: *western-blot*.

Las subunidades NR2A y NR2B del NMDAR forman complejos estables con las proteínas reguladoras $\alpha 2\delta 1$ (Chen y col., 2018), lo que podría bloquear el acceso de estas subunidades a los canales TRPA1. Por ello, evaluamos si la región citosólica C0-C1-C2 de la NR1 del NMDAR interactúa con el TRPA1. En este sentido, se obtuvo que la NR1 no se asocia directamente con las regiones Nt y Ct del canal TRPA1, pero la presencia de

la CaM activada por calcio favorece estas interacciones, de forma similar a lo observado previamente para el MOR (Figura 72).

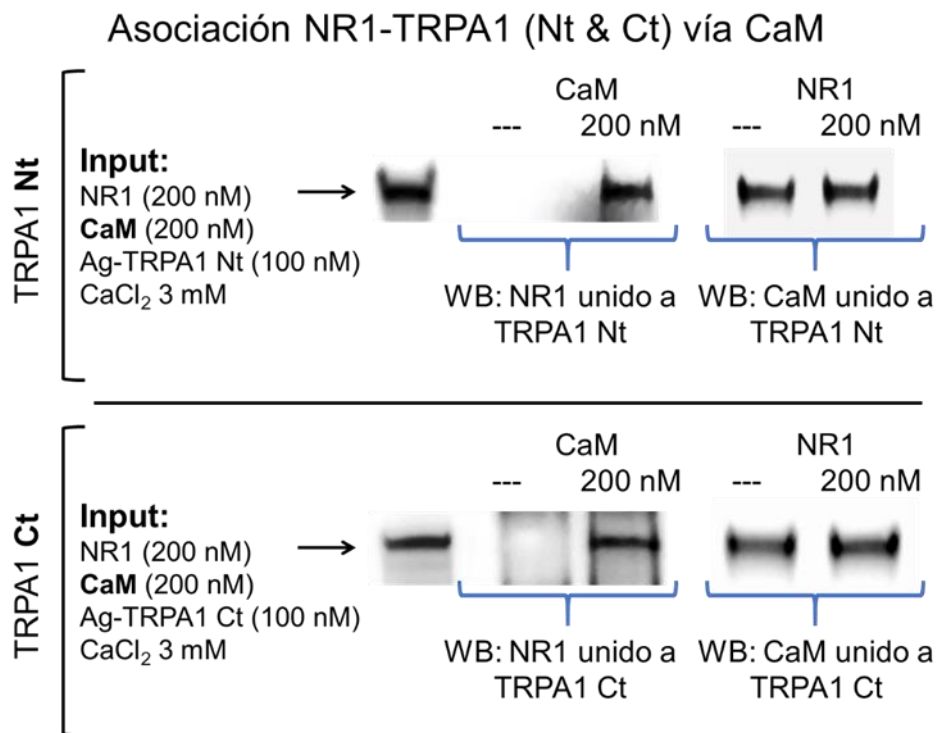


Figura 72. La CaM media la asociación del TRPA1 con la subunidad NR1 del NMDAR. Las regiones amino y carboxilo terminales (Nt y Ct, respectivamente) del TRPA1 acopladas covalentemente a NHS-agarosa se incubaron con la NR1 en ausencia y presencia de 3 mM de CaCl₂. En otros ensayos, las regiones del TRPA1 se incubaron secuencialmente con CaM y después con la NR1 del NMDAR en presencia de 3 mM de CaCl₂. Al final de la incubación, se recuperó la agarosa-TRPA1 y se sometió a varios ciclos de lavado-resuspensión y las proteínas unidas al TRPA1 se separaron y se analizaron por *western-blot*. WB: *western-blot*.

Discusión

Este trabajo de Tesis Doctoral aborda nuevos aspectos funcionales de la proteína HINT1. La disponibilidad de ratones carentes de la HINT1 nos ha permitido proponer la relevancia de esta proteína en el comportamiento normal del ratón. Así, su ausencia facilita la aparición de conductas de tipo maniaco que, en respuesta al estrés, desembocan en episodios de tipo depresivo, por lo que los animales KO del gen *HINT1* pueden constituir un modelo animal en el que estudiar diferentes facetas del trastorno bipolar humano.

Por otra parte, hemos demostrado la actividad isopeptidasa (sumoilasa) de la HINT1, y que esta propiedad está alterada en los mutantes de la HINT1 que en humanos causan alteraciones motoras como la ARAN-NM. Asimismo, la HINT1 establece una serie de asociaciones con diferentes proteínas de señalización cuya relevancia funcional se sugiere en nuestro estudio, fundamentalmente por su alteración en aquellos mutantes relacionados con la ARAN-NM.

Estudios previos han descrito que los ratones KO de la HINT1 presentan conductas tipo ansiedad y una mayor respuesta a psicoestimulantes (Barbier y col., 2007; Varadarajulu y col., 2011). La caracterización fenotípica de los ratones *HINT1*^{-/-} proporcionó una serie de parámetros similares a los que presentan los ratones BStac, que se aceptan como un modelo animal de la manía humana. Sin embargo, a diferencia de los ratones BStac, los ratones *HINT1*^{-/-} respondieron a situaciones de estrés con un viraje comportamental hacia estados depresivos. El estudio farmacológico que realizamos sobre estos animales nos ha permitido descubrir la actividad antimaniaca de los antagonistas del $\sigma 1R$, y nos sugiere que en estos ratones *HINT1*^{-/-} se podría evaluar la potencialidad de fármacos para el tratamiento del trastorno bipolar humano.

Mediante estudios *in vitro* se ha descrito una actividad hidrolasa para la HINT1; sin embargo, se desconocen los sustratos naturales que la sustentan y, por tanto, su posible relevancia fisiológica (Gilmour y col., 1997; Bieganowski y col., 2002; Chou y col., 2007a; Krakowiak y col., 2007). Lo que sí se conoce es que esta actividad enzimática no afecta a la capacidad de la HINT1 para inducir la apoptosis, ya que la mutación de su centro catalítico no altera su actividad proapoptótica (Weiske y Huber, 2006).

Numerosos trabajos han descrito la interacción de la HINT1 con proteínas sumoiladas tanto en la membrana plasmática como en el núcleo (Su y col., 2003; Li y col., 2006; Rodríguez-Muñoz y col., 2011). Con este antecedente, analizamos la

estructura de la HINT1 observando la presencia de un dominio SIM de interacción con SUMO, así como de dos cisteínas en un dominio típico de una actividad SUMO proteasa. Nuestro estudio nos llevó a identificar la actividad isopeptidasa de la HINT1, así como su regulación por Ca^{2+} -CaM y NO. La HINT1 actúa sobre diferentes sustratos, ya sean proteínas de membrana o de localización nuclear, como la RGSZ2 y el ICD de la teneurina 1, necesarias para mantener el tono sináptico y regular la transcripción génica.

La identificación de 15 mutaciones puntuales de la HINT1 como causantes de un trastorno motor denominado ARAN-NM (Zimon y col., 2012), nos indujo a evaluar su posible influencia sobre las características moleculares de la HINT1. Los mutantes humanos de la HINT1 muestran patrones de interacción con proteínas de señalización que divergen de los de la HINT1 WT, y la mayoría de ellos presentan una pobre asociación con otras proteínas. De igual modo, la actividad SUMO proteasa está ausente en muchos de estos mutantes de la HINT1, y presente, pero desregulada, en los mutantes E34K, R37P, C38R y H51R.

Conocida la relación de la HINT1 con el canal de calcio regulado por glutamato, el receptor de NMDA, exploramos si esta proteína también se relaciona con otros canales de calcio, como los TRPs. Con este fin, estudiamos la posible asociación de la HINT1, el σ 1R y la CaM con los dominios citosólicos de ciertos canales TRPs seleccionados. Observamos que el tipo de interacción de estas tres proteínas varía entre los diferentes TRPs, e incluso entre los extremos N- y C-terminales del mismo canal. Un hallazgo con posible relevancia farmacológica es que el efecto de los ligandos del σ 1R sobre su asociación con estos TRPs difiere en función del complejo σ 1R-TRP estudiado.

Estudios previos han descrito una regulación cruzada entre el receptor antinociceptivo MOR y el pro-nociceptivo NMDA, lo que nos llevó a analizar si esta relación se podría extender al canal TRPA1, muy implicado en quimionocicepción. Nuestros resultados mostraron que, en sinaptosomas de diferentes regiones nerviosas, el TRPA1 coprecipita con ambos receptores, MOR y NMDAR, y que esta asociación se modifica en respuesta a diferentes tratamientos farmacológicos y modelos de dolor neuropático e inflamatorio. Los ensayos *in vitro* con proteínas sugieren que la CaM es necesaria para la formación de los complejos MOR-TRPA1 y NR1-TRPA1.

1. Animales KO de la HINT1 como modelo del síndrome bipolar humano

Un modelo animal del trastorno bipolar humano debe exhibir las alteraciones moleculares y conductuales típicas de esta enfermedad. Además, los tratamientos farmacológicos deben actuar únicamente sobre la conducta de los animales alterados, normalizándola, sin afectar a la de los animales considerados normales. De acuerdo con estas condiciones, nuestro estudio reveló que los ratones HINT1^{-/-} presentan cambios moleculares y de comportamiento similares a los descritos en los pacientes bipolares. Asimismo, los tratamientos usados en clínica, tales como estabilizadores del ánimo e inhibidores de la PKC y la GSK3 β , normalizaron la conducta de los ratones KO de la HINT1, sin que se apreciaran cambios en la de los controles HINT1 WT.

De forma espontánea, los animales deficientes de la HINT1 manifiestan una conducta “maniaca” similar a la observada en los BStac, un modelo aceptado que reproduce ciertos aspectos de la manía humana (Hannah-Poquette y col., 2011). A nivel molecular, la conducta “maniaca” se acompaña de una mayor actividad de la GSK3 β (Polter y col., 2010). En nuestro estudio, los inhibidores de la GSK3 β y los estabilizadores del ánimo no alteraron el comportamiento de los ratones control, pero sí redujeron la movilidad de los KO de la HINT1 y de los BStac en el test de la natación forzada. Numerosos estudios sugieren que la actividad de la quinasa GSK3 β es un marcador de ciertos desórdenes mentales. Sin embargo, actualmente no hay ningún método directo y fiable que nos permita evaluar la actividad de la GSK3 β , por lo que procedimos al estudio de los niveles de sus fosforilaciones reguladoras para determinar el índice de actividad enzimática de esta quinasa.

El control negativo de la actividad de la GSK3 β recae principalmente en la fosforilación de la serina 9, que se produce principalmente por la Akt. Por el contrario, la actividad de la GSK3 β se potencia mediante la fosforilación de la tirosina 216 (Hughes y col., 1993). Los niveles de la P-S9 están reducidos a la mitad en los ratones BStac y son casi nulos en los KO de la HINT1. Por otro lado, los niveles de la P-Y216 en los animales KO de la HINT1 son inferiores a los de sus controles los HINT1 WT, mientras que esta fosforilación activadora está muy elevada en los BStac. No obstante, tanto los ratones HINT1^{-/-} como los BStac evidencian conductas “maniacas” típicas de una actividad exacerbada de la GSK3 β . La fosforilación en la Y216 incrementa en 200 veces la actividad de la quinasa GSK3 β (Hughes y col., 1993), por lo que P-Y216 puede potenciar significativamente la función enzimática aun cuando haya niveles elevados de Ser9

fosforilada. Teniendo en cuenta los niveles de ambas fosforilaciones reguladoras, es muy probable que la actividad de la GSK3 β sea más elevada en los ratones BStac que en los BScr, así como también sería superior en los animales HINT1^{-/-} con respecto a los controles HINT1^{+/+}.

Aparte de los niveles de fosforilación de la GSK3 β , los niveles de la β -catenina pueden indicarnos la actividad de esta quinasa. La GSK3 β fosforila a la β -catenina promoviendo su degradación, que se correlaciona con una menor neurogénesis y el inicio de episodios depresivos (Kaidanovich-Beilin y col., 2004). Desafortunadamente, una serie de alteraciones fisiológicas, como las que ocurren en los ratones KO de la HINT1 comprometen la idoneidad de la β -catenina como un marcador de la actividad de la GSK3 β . Las proteínas de la familia HIT, como la HINT1 y la FHIT, inhiben la actividad transcripcional de la β -catenina (Huber y Weiske, 2008); por tanto, en ausencia de la HINT1, la β -catenina estaría desregulada, lo que podría compensar los efectos de la elevada actividad de la GSK3 β . De acuerdo con esto, en los animales KO de la HINT1 se ha observado una potenciación de la neurogénesis, a la vez que unos bajos niveles de fosforilación en la Ser9 de la GSK3 β y de la β -catenina (Garzón y col., 2017). Probablemente, este fenómeno se debe a un incremento en la actividad transcripcional de la β -catenina y una mayor actividad de la PKC (Abrial y col., 2013).

El test de la natación forzada resultó especialmente útil para caracterizar las diferencias comportamentales y las respuestas a los tratamientos farmacológicos. En esta situación estresante, la conducta de los animales está determinada por el equilibrio entre la actividad natatoria y su regulación negativa (mecanismos bloqueantes). En humanos, la depresión se asocia con un aumento en la actividad del receptor de glutamato de NMDA. El bloqueo por ketamina de este receptor conduce a unos rápidos y significativos efectos antidepresivos en pacientes con depresión mayor que no responden a los fármacos tradicionales (Maeng y col., 2007; Naughton y col., 2014). Los bloqueantes del NMDAR y los antidepresivos convencionales no promueven conductas pro-actividad en humanos. Por el contrario, estos compuestos impiden el desarrollo de los mecanismos que se oponen a la actividad (mecanismos anti-actividad), lo que resulta en una potenciación de la movilidad de los ratones durante el test de la natación forzada.

El estudio comparativo de las conductas exhibidas por los animales KO de la HINT1 y los BStac nos sugiere la existencia de una regulación cruzada entre los mecanismos moleculares que subyacen al comportamiento “maniaco” y aquellos responsables de la

conducta “depresiva”. Esta idea se fundamenta en una serie de observaciones. Por ejemplo, en la prueba de la natación forzada, los ratones control HINT1 WT y los BScr mostraron comportamientos “depresivos” sensibles al tratamiento con citalopram y MK801, que aumentaron la actividad de ambos grupos de animales en este paradigma. Sin embargo, estos compuestos no alteraron la conducta de los animales “maniacos” BStac, y sólo ligeramente la de los HINT1^{-/-}. Mientras que el estrés promovió la aparición de conductas “depresivas” en los ratones KO de la HINT1, los BStac no mostraron este tipo de comportamientos. Por tanto, aunque los HINT1^{-/-} como los BStac exhiben conductas “maniacas”, sólo se produce un viraje comportamental hacia la “depresión” en los ratones deficientes de la HINT1.

La supresión durante un largo plazo de las conductas pro-depresivas podría facilitar la aparición de síntomas maniacos, de forma similar a lo observado en los pacientes con depresión que manifiestan estos signos tras llevar largo tiempo tomando antidepresivos (Martin y col., 2004; Patel y col., 2015). De hecho, se cree que los factores ambientales estresantes desencadenan la fase depresiva en los pacientes bipolares, y el uso de los antidepresivos tricíclicos durante estos episodios depresivos puede precipitar la expresión de la manía (Henry y col., 2001; Pary y col., 2006). La administración del MK801, y en menor medida del citalopram, redujo los comportamientos “depresivos” de los ratones control HINT1 WT al potenciar su actividad, a la vez que restituyó el estado “maniaco” en los animales KO de la HINT1 estresados. Esta observación es favorable al uso de los ratones KO de la HINT1 como modelo animal del trastorno bipolar humano. La actividad “maniaca” de los BStac evita que el estrés desencadene estos mecanismos “pro-depresivos”, los cuales apenas se expresan en estos animales debido a la potencia de la faceta “maniaca” en ellos. Como prueba de esta idea, los fármacos que reducen el comportamiento “maniaco”, como los estabilizadores del ánimo y los inhibidores de la GSK3 β , debilitaron el vigor natatorio de los BStac.

Es posible que los procesos neuronales que estimulan y obstruyen la actividad del sujeto no se alternen, sino que compitan por predominar. En un individuo normal, el resultado de este antagonismo moldea su conducta para adaptarse a los cambios del entorno. Sin embargo, si la intensidad con la que se manifiesta uno o los dos tipos de mecanismos compromete la adaptación del sujeto al medio, entonces aparecen los síntomas de la manía, depresión o incluso el trastorno bipolar. En los ratones “maniacos” BStac, los procesos que promueven la actividad son más fuertes y predominan sobre el

mecanismo antagonista. Por el contrario, en los ratones KO de la HINT1, el estrés desencadena la conducta “depresiva”. Así, varias horas después de haber sido expuestos a la situación estresante, los ratones carentes de la HINT1 empiezan a comportarse como sus controles HINT1 WT en diferentes experimentos, incluida la natación forzada y el test de suspensión de la cola (Garzón y col., 2017). A partir de ese momento, los ratones KO de la HINT1 tienden a mostrar conductas “depresivas” en respuesta a situaciones estresantes consecutivas; este fenómeno perdura durante un par de semanas (Garzón y col., 2017). Por tanto, si se experimenta con los ratones HINT1^{-/-} previamente expuestos a otras pruebas, se obtienen resultados sesgados, ya que su comportamiento ha variado con respecto al inicial (Barbier y Wang, 2009; Varadarajulu y col., 2011; Garzón y col., 2017). Para evitar este inconveniente, en nuestro estudio los ratones WT/KO de la HINT1 se emplearon una sola vez.

En el trastorno bipolar, el aumento en la actividad de la PKC aparentemente contribuye a la fase maniaca (Friedman y col., 1993). Los últimos estudios en los que se evaluó el tamoxifeno, un inhibidor de la PKC, han confirmado la importancia de esta diana terapéutica en el trastorno bipolar (Zarate y Manji, 2009). De hecho, los estabilizadores del ánimo, como el valproato y las sales de litio, son efectivos en el tratamiento de la manía bipolar porque probablemente inhiben indirectamente la señalización de la PKC (Flaisher-Grinberg y Einat, 2010). La actividad de la PKA también está aumentada en los pacientes bipolares maníacos y reducida en los depresivos (Dwivedi y Pandey, 2008). Así, los ratones KO de la HINT1 exhiben una actividad elevada tanto de la PKC como de la PKA. La inhibición de estas quinasas reduce la conducta “maniaca” de los HINT1^{-/-}, lo que se traduce en una menor movilidad en el test de la natación forzada (Garzón y col., 2017).

Además, la inhibición de la PKC aumentó la GSK3 β P-S9 en los ratones HINT1^{-/-} promoviendo un comportamiento “depresivo”, ya que redujo su actividad natatoria. Sin embargo, el bloqueo de la PKC no afectó a la GSK3 β en los controles HINT1 WT ni tampoco alteró su comportamiento. La actividad de la PKC también se encuentra elevada en los ratones BStac, aunque su inhibición no altera su comportamiento de forma significativa (Einat, 2014; Garzón y col., 2017). Por tanto, la desregulación en la actividad de la PKC no necesariamente promueve la manía, pero podría estar involucrada en otros aspectos del trastorno bipolar (Friedman y col., 1993; Hahn y Friedman, 1999). Los niveles de actividad de la PKC, la PKA y la GSK3 β están elevados en la manía, pero

sólo los inhibidores de la quinasa GSK3 β redujeron la movilidad tanto de los ratones HINT1^{-/-} como de los BStac. La inhibición de la PKC y el estrés provocaron conductas “depresivas” únicamente en los ratones KO de la HINT1, lo que sugiere que estos ratones sufren alteraciones fisiológicas que no se reproducen en los BStac.

Los estudios neuropatológicos muestran una menor expresión de las subunidades NR2A en los pacientes bipolares (McCullumsmith y col., 2007) y la eliminación del gen *NR2A* provoca conductas “maníacas” en ratones (Boyce-Rustay y Holmes, 2006) que, como hemos demostrado, se manifiestan espontáneamente en los animales KO de la HINT1 (Barbier y Wang, 2009). Por el contrario, los niveles de la subunidad NR2A se encuentran elevados en la amígdala lateral de pacientes depresivos y en ratas aisladas, que son un modelo animal para el estudio de antidepresivos (Karolewicz y col., 2009; Turnock-Jones y col., 2009). La predominancia de receptores de NMDA con subunidades NR2A se asocia con episodios depresivos, mientras que si prevalece la subunidad NR2B los episodios son de tipo maniaco.

Aunque los niveles de la NR2A son similares en los ratones WT y KO de la HINT1, los niveles de la NR2B son significativamente superiores en los HINT1^{-/-}. Los canales de calcio del receptor de NMDA constituidos por subunidades NR2B, NR2C o NR2D presentan una menor probabilidad de abrirse que aquellos que contienen subunidades NR2A. Así, los receptores de NMDA con NR2B exhiben una cinética más lenta y contribuyen principalmente a la LTD, mientras que los NMDARs mixtos de NR2A/NR2B median la LTP (Fountoulakis, 2012; Paoletti y col., 2013; France y col., 2016). Por tanto, las alteraciones en el NMDAR podrían causar las diferentes respuestas de los animales BStac y los KO de la HINT1 tras ser sometidos tanto a situaciones estresantes como a distintos tratamientos farmacológicos. En los ratones deficientes de la HINT1 las relaciones NR2B/NR2A y NMDAR/AMPA están aumentadas, lo que implica una predominancia de los receptores de NMDA constituidos por subunidades NR2B y una alternancia LTD/LTP alterada (Hall y col., 2007).

La GSK3 β también juega un papel crucial en la plasticidad sináptica. La inhibición de la GSK3 β favorece la LTP mediada por el NMDAR, mientras que la activación de esta quinasa contribuye a la LTD (Zhu y col., 2007). Por tanto, en los ratones deficientes de la HINT1, la LTD prevalece ya que estos ratones presentan niveles elevados de la NR2B y también de la actividad de la GSK3 β .

Los pacientes bipolares son esencialmente maniacos, pero pueden desarrollar depresión en respuesta a desencadenantes ambientales. Este proceso requiere que confluyan fallos tanto en la función de la PKC como en la actividad del NMDAR. La PKC regula la función del NMDAR fosforilando directamente serinas en las subunidades NR1 y NR2, pero también regulando a la quinasa Src, que fosforila tirosinas en las subunidades NR2 (Jones y Leonard, 2005). La HINT1 se une a la PKC y controla negativamente su actividad; de hecho, la eliminación del gen *HINT1* facilita la actividad quinasa de la PKC (Garzón y col., 2017), y esto provoca alteraciones en la función NMDAR, estando ambos fenómenos relacionados con la fisiopatología del trastorno bipolar humano.

La PKC y los NMDARs son fundamentales para el adecuado desarrollo neuronal y la formación de circuitos. La inhibición de la PKC, o el bloqueo de los NMDARs, altera la sinaptogénesis, por lo que se ha propuesto que la PKC participa en un proceso dirigido por los receptores de glutamato en la estabilización de las sinapsis inmaduras (Schmidt y col., 2004). La expresión de las subunidades NR2 varía durante el desarrollo; así, la NR2B juega un papel dominante en la función del NMDAR en la corteza del cerebro fetal y de los recién nacidos. Por el contrario, la expresión de la NR2A aumenta gradualmente en todo el cerebro tras el nacimiento (Wenzel y col., 1997). Ambas subunidades, NR2A y NR2B, funcionan de forma solapada en el desarrollo dendrítico, aunque el aumento paulatino de los niveles de la NR2A supone la formación de nuevas sinapsis sin NR2B (Liu y col., 2004; Ewald y col., 2008). La PKC favorece la probabilidad de apertura del canal, pero únicamente en los NMDARs con subunidades de tipo NR2A y no NR2B (Xiong y col., 1998). En este escenario, una actividad anormalmente elevada de la PKC durante el desarrollo cerebral podría reducir la expresión de las subunidades NR2A, lo que conduciría a un predominio de la NR2B. En las situaciones más graves, estos cambios producirían alteraciones en los circuitos cerebrales, que pudieran ser la causa del trastorno bipolar humano. De hecho, una menor expresión de la subunidad NR2A afecta a la neuroplasticidad, tal y como se ha observado en modelos animales de traumatismo en cerebro inmaduro (Giza y col., 2006).

La proteína HINT1 se coordina con el $\sigma 1R$ para modular la regulación cruzada que se establece entre los GPCRs y los NMDARs. Varios estudios han sugerido el potencial de los ligandos del $\sigma 1R$ en el tratamiento de enfermedades mentales como la esquizofrenia y la depresión (Hayashi y Su, 2004; Wang y col., 2007; Fishback y col., 2010). Sin

embargo, éste es el primer estudio que ha mostrado que los antagonistas del σ 1R pueden reducir la incidencia de los síntomas “maniacos” en modelos animales. Los ligandos del σ 1R se administraron por vía icv a concentraciones equimolares, a las que son efectivas en la regulación de la analgesia inducida por los opioides (Sánchez-Blázquez y col., 2014; Rodríguez-Muñoz y col., 2015b). Nuestros resultados han demostrado que los antagonistas del σ 1R como S1RA, BD1063 y BD1047 normalizan la conducta de los ratones BStac y KO de la HINT1 sin alterar el comportamiento de los controles BScr y HINT1 WT. El antagonista S1RA fue más eficaz contrarrestando la conducta “maniaca” que los otros antagonistas evaluados. Este resultado corrobora datos previos que muestran que el S1RA es el antagonista más selectivo de este receptor en modelos experimentales *in vivo* en los que se analiza la actividad agonista/antagonista de los ligandos del σ 1R (Sánchez-Blázquez y col., 2014).

El inhibidor de la GSK3 β , el TDZD8, y los antagonistas del σ 1R reducen la hiperactividad de ambas cepas de ratones “maniacos”, acercando el nivel de su actividad natatoria al de sus controles. Sin embargo, la co-administración del MK801 reveló ciertas diferencias en el modo en que ambos tipos de compuestos controlan la conducta “maniaca”. Mientras que el MK801 redujo los efectos anti-maniacos del valproato, S1RA y TDZD8 en los ratones BStac, el antagonista del NMDAR contrarrestó más débilmente los efectos de estos compuestos en los ratones HINT1^{-/-}. Este resultado también nos sugiere que los animales BStac y KO de la HINT1 modelan diferentes tipos de la manía humana, la de tipo bipolar I y II, respectivamente.

El antagonismo del σ 1R promueve el desacoplamiento físico y funcional de ciertos GPCRs respecto a los NMDARs (Rodríguez-Muñoz y col., 2015a). En este sentido, los ligandos antagonistas del σ 1R favorecen la transferencia de la HINT1 desde los GPCRs activados a los receptores de NMDA, lo que desacopla el control que los GPCRs ejercen sobre la función glutamatérgica. Asimismo, los antagonistas del σ 1R previenen/retiran la unión de su receptor a la subunidad NR1, lo que favorece la unión de Ca²⁺-CaM y, por consiguiente, la inactivación de aquellos NMDARs primados previamente por los GPCRs. Al reducir la influencia de los GPCRs sobre la función del NMDAR, así como la permeación de los previamente activados, los antagonistas del σ 1R mitigan la alodinia y el daño neural en los modelos animales de neuropatía e ictus, respectivamente (Rodríguez-Muñoz y col., 2015b; Sánchez-Blázquez y col., 2018).

Los únicos receptores de NMDA que se acoplan con los GPCRs vía HINT1- σ 1R son aquellos con subunidades NR1 que presentan el segmento C1 citosólico (Rodríguez-Muñoz y col., 2015b). La ausencia de la HINT1 dificulta la capacidad de los GPCRs de potenciar la función de los NMDARs. En los ratones carentes de la HINT1 se aprecia un aumento de las subunidades NR1 C1 y una mayor sensibilidad a los activadores sinápticos, lo que parece compensar la hipofunción del NMDAR (Vicente-Sánchez y col., 2013). La actividad exacerbada de la PKC en estos animales aumenta la función de la GSK3 β , lo que conlleva una menor liberación presináptica de glutamato, así como de otros neurotransmisores (Zhu y col., 2007). El estrés agudo, la inhibición de la PKC y ciertos inhibidores de la GSK3 β potencian la liberación de neurotransmisores, causando la hiperactivación de los NMDARs alterados y el consiguiente desarrollo de conductas “depresivas”. El modelo animal de ictus en los KO de la HINT1, consistente en la oclusión permanente de la arteria cerebral media, muestra la hipofunción de los NMDARs en estos ratones y la mayor sensibilidad de estos receptores a sus activadores (Vicente-Sánchez y col., 2013; Rodríguez-Muñoz y col., 2015b; Garzón y col., 2017).

El MK801 evitó que el estrés desencadenase conductas “depresivas” en los animales HINT1^{-/-}. De forma similar, la ketamina y la memantina contrarrestan los síntomas depresivos y amortiguan el viraje comportamental en los pacientes bipolares (Fond y col., 2014; McGirr y col., 2015; Serra y col., 2015), lo que sugiere que en estos individuos se producen alteraciones en la función del NMDAR comparables a las observadas en los ratones KO de la HINT1. En estos mismos ratones, la inhibición de la GSK3 β por el TDZD8 redujo su actividad “maníaca”, pero la coadministración del MK801 con el TDZD8 apenas alteró el efecto inicial del inhibidor de la GSK3 β . Por tanto, es posible que la reducción en la actividad de los mecanismos “pro-maniacos” cause un equilibrio entre los procesos fisiológicos promotores e inhibidores de la actividad murina. En este sentido, la inhibición de la GSK3 β debilitaría los procesos “pro-actividad”, lo que haría innecesario una fuerza pro-depresiva elevada para oponerse a ella, por lo que indirectamente reduciría la conducta “depresiva” mediada por el NMDAR.

La calcineurina, una fosfatasa dependiente de calcio y CaM, puede disminuir los niveles de la serina 9 fosforilada de la GSK3 β , con el consiguiente efecto pro-maniaco. Sin embargo, la actividad de la calcineurina se encuentra mermada en los ratones KO de la HINT1, probablemente debido a la activación de su inhibidor Cabin/Cain, que está mediada por la PKC (Sun y col., 1998; Garzón y col., 2017). Por tanto, la PKC es capaz

de regular los niveles de la Ser9 fosforilada de la GSK3 β mediante el control de las actividades opuestas de la Akt y de la calcineurina. Considerando el posible papel de la PKC en la manía, la inhibición de esta quinasa en los animales BStac reduce la hiperactividad inducida por la anfetamina en el actímetro (Garzón y col., 2017), pero apenas perturbó su actividad natatoria. La PKC no modifica los niveles de fosforilación de la Y216 de la GSK3 β , que es la fosforilación predominante en los BStac. Por tanto, la PKC controlaría de forma limitada la actividad de la GSK3 β , lo suficiente para disminuir el efecto de los psicoestimulantes, pero no el impacto de elementos más estresantes, como el test de la natación forzada. En los animales BStac, los elevados niveles de la Y216 fosforilada de la GSK3 β impiden que la inhibición de la PKC reduzca la conducta “maniaca”, aun cuando el bloqueo de la PKC conlleve un aumento de la fosforilación en la Ser9.

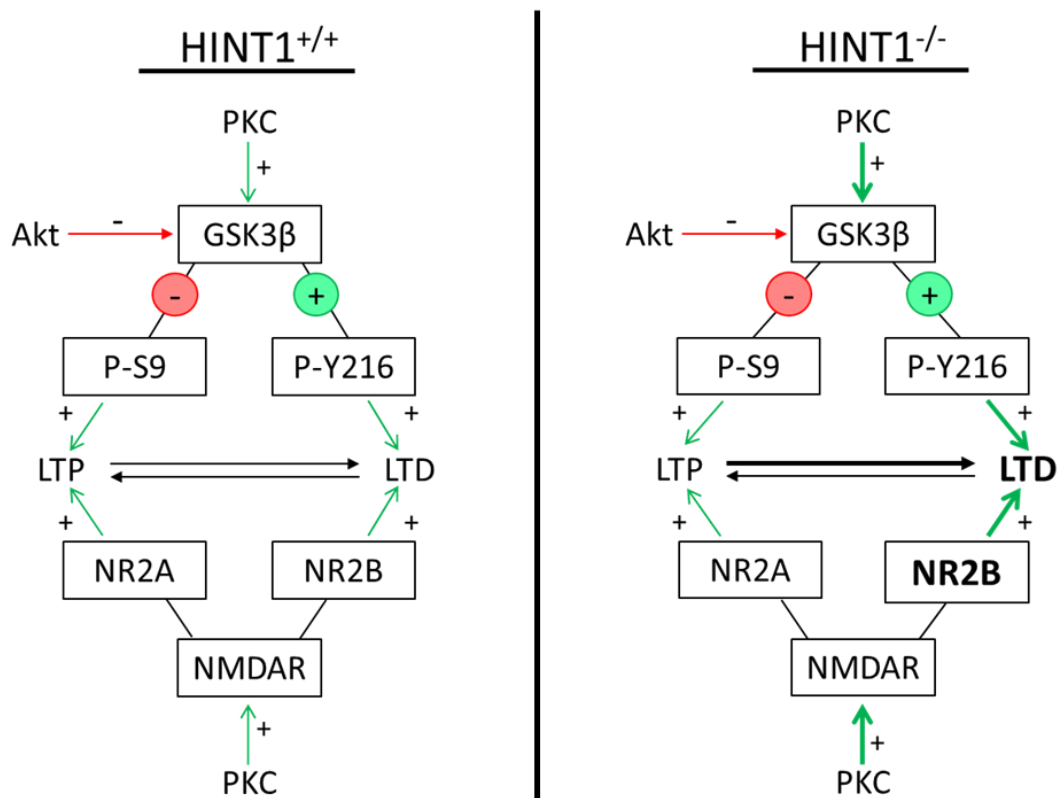


Figura 73. Diagrama de la ruta Akt/GSK3 β y NMDAR y su alteración en los ratones KO de la HINT1.

En los ratones KO de la HINT1, los niveles de las fosforilaciones reguladoras de la GSK3 β son moderados y menores que los observados en los controles HINT1 WT. Este resultado nos hizo cuestionarnos si los niveles bajos de la P-Y216 podrían promover la conducta “maniaca” en los animales HINT1^{-/-}. Es de destacar que la inhibición de la PKC

en estos animales sí redujo su movilidad en el test de la natación forzada. Por el contrario, los ratones HINT1^{+/+}, BScr y BStac no mostraron una relación NR2B/NR2A elevadas y tampoco la inhibición de la PKC modificó su comportamiento en la prueba de la natación forzada. Por tanto, estos datos sugieren que la GSK3 β regulada por la PKC colabora con los receptores de NMDA enriquecidos en la NR2B facilitando la LTD sináptica en los ratones KO de la HINT1 (Figura 73). Esto explicaría la implicación simultánea de la GSK3 β y la PKC en la manía bipolar. En este sentido, la PKC y la ruta Akt/GSK3 β se han asociado con los cambios producidos por el entorno en el comportamiento de los pacientes bipolares (Del'Guidice y Beaulieu, 2010). Así, la actividad exacerbada de la PKC en combinación con una función anómala del NMDAR participaría en la manía bipolar y disminuiría la aparición de conductas “depresivas” inducidas por estrés.

Nuestro estudio sobre los ratones carentes de la HINT1 puede aportar información relevante para el tratamiento del trastorno bipolar humano. Estos resultados confirman que los fármacos que inhiben selectivamente a la PKC son terapéuticamente interesantes. La inhibición de la PKC reduce los mecanismos pro-maniacos principalmente porque recluta las conductas depresivas dependientes del NMDAR. De hecho, el estudio realizado con el tamoxifeno, un inhibidor de la PKC, indica que es posible reducir la manía sin desencadenar conductas depresivas desmesuradas. Dado que existe un equilibrio entre estos comportamientos opuestos, los tratamientos que reducen selectivamente la actividad pro-maniaca estarían promoviendo indirectamente una depresión reactiva moderada. El valproato y la mayoría de los inhibidores de la GSK3 β provocan estos efectos, ya que es posible que la administración crónica de estos fármacos altere la actividad de la PKC.

Por tanto, nuestros resultados junto con los de estudios previos sugieren que en el trastorno bipolar humano la depresión y la manía coexisten como fuerzas opuestas, y no alternantes. La consecuencia de este antagonismo emocional es un aparente viraje conductual típico de este desorden mental. Los ratones carentes de la HINT1 son un modelo animal válido para esta enfermedad humana, pudiendo emplearse para descubrir nuevos fármacos, identificar nuevas dianas terapéuticas y ajustar el protocolo farmacológico dependiendo de la participación del NMDAR en las fases específicas de la enfermedad. Además, los ligandos selectivos del σ 1R pueden considerarse como fármacos potenciales para aliviar la conducta maniaca, ya que mejoran los síntomas

asociados con esta patología en modelos animales, pero sin alterar el comportamiento de los ratones control.

2. Actividad SUMO proteasa de la HINT1

La sumoilación es una modificación postraducciona que modula la capacidad de una determinada proteína para interactuar con otra u otras proteínas. El SUMO es un pequeño polipéptido de unos 100 aminoácidos que se une covalentemente a la proteína diana mediante la acción de enzimas específicas de este proceso (Hay, 2005). Para que la sumoilación tenga lugar se requiere la presencia de una lisina contenida en una secuencia aminoacídica característica. Esta modificación puede revertirse (desumoilación) por isopeptidasas denominadas sumoilasas, de las que se conocen 3 grupos. Las SENPs fueron las primeras SUMO proteasas descritas, seguidas de la familia DeSI y la enzima USLP1 (Xu y col., 2009; Shin y col., 2012; Schulz y col., 2012). Nuestros resultados han demostrado la actividad SUMO proteasa de la proteína HINT1, actividad no compartida por sus hermanas HINT2 y HINT3.

Las proteínas DeSI homodimerizan, con el sitio activo situado en la hendidura entre los dos protómeros (Suh y col., 2012). Esta organización funcional es similar a la observada para la HINT1 en estudios estructurales, ensayos de doble híbrido en levaduras y tras su purificación bioquímica, mostrando que la HINT1 puede existir en forma de homodímero, interaccionando a través de sus secuencias C-terminales (Pearson y col., 1990; Lima y col., 1996).

Los miembros de las familias SENP y DeSI constan de un dominio SIM en su secuencia, ya sea fuera de la región catalítica como en las SENPs, o dentro de ella como en las DeSIs (Hickey y col., 2012). El análisis computacional de la HINT1 no detecta posibles sitios de sumoilación, pero sugiere la existencia de un dominio SIM en la secuencia 110-116 **HIHLHVL**. Pudimos comprobar que la HINT1 une SUMO, y una serie de mutantes puntuales de esta región candidata (H112N, H114R, V115D y L116Q) redujo muy notablemente su capacidad de unir SUMO2, confirmando la presencia de un SIM en esta secuencia.

Los miembros de la familia SENP desumoilan una gran cantidad de sustratos. Sin embargo, la actividad de las DeSIs se ejerce sobre muy pocas proteínas, al igual que la USLP1 (Shin y col., 2012; Schulz y col., 2012). Las isopeptidasas DeSIs son capaces de

escindir las cadenas de poliSUMO2/3, pero no de procesar las moléculas de SUMO inmaduras (Shin y col., 2012). Nuestro estudio mostró la actividad sumoilasa de la HINT1 sobre la RGSZ2, el ICD de la teneurina 1 y la RanGAP1. No obstante, la HINT1 no actúa sobre los precursores de SUMO ni ataca cadenas de poliSUMO2/3 (Cortés-Montero y col., 2019b).

La secuencia de la HINT1 no revela la presencia de estructuras tipo *zinc finger*; sin embargo, esta proteína puede unir este metal divalente, mientras que su capacidad de unir calcio genera cierta controversia (McDonald y Walsh, 1985; McDonald y col., 1987; Pearson y col., 1990). Las cisteínas y las histidinas son los aminoácidos que unen iones metálicos con mayor afinidad, como el Ni^{2+} , el Zn^{2+} y el Cu^{2+} . Las cisteínas son capaces de unir zinc y tras su unión, el NO ataca al grupo tiol, promoviendo la liberación del ion zinc inalterado. Este proceso produce la S-nitrosilación de los grupos tioles de las cisteínas y la liberación de iones zinc divalentes (Maret, 2006; Zheng y col., 2008). La modificación producida por el NO se revierte por la S-nitrosoglutatión reductasa o el sistema de la tioredoxina (Shahani y Sawa, 2011). Dado que el NO no separa los iones zinc de las histidinas, la regulación por NO de la actividad sumoilasa de la HINT1 se produciría sobre el zinc unido a cisteínas sitas en su región catalítica. En este escenario, la inhibición de esta actividad por el zinc se revierte por NO y también por CaM, la cual se ha visto que puede secuestrar iones de zinc de otras proteínas (Warren y col., 2007; Kumar y col., 2013). Así, la CaM activada por calcio, tras unirse al extremo amino terminal de la HINT1, accedería a la cisteína bloqueada por zinc para secuestrar al ion metálico.

Estas dos vías de activación de la HINT1 presentan ciertas diferencias que pueden tener relevancia funcional (Figura 74). La Ca^{2+} -CaM capturaría al zinc presente en la HINT1 sin modificar el grupo tiol de la cisteína, lo que permite que, al disociarse la CaM, los iones zinc accedan de nuevo a la cisteína bloqueando la actividad isopeptidasa. Por el contrario, el NO, al promover la S-nitrosilación del grupo tiol, impide la reasociación del zinc. En consecuencia, al disociarse la Ca^{2+} -CaM, los iones de zinc libres bloquearían rápidamente la actividad isopeptidasa de la HINT1, pero la promovida por el NO perduraría hasta la reducción del grupo tiol de la cisteína clave. Por tanto, la HINT1 presenta una regulación de su actividad SUMO proteasa por iones zinc, CaM y procesos redox que no se ha descrito para los otros grupos de sumoilasas.

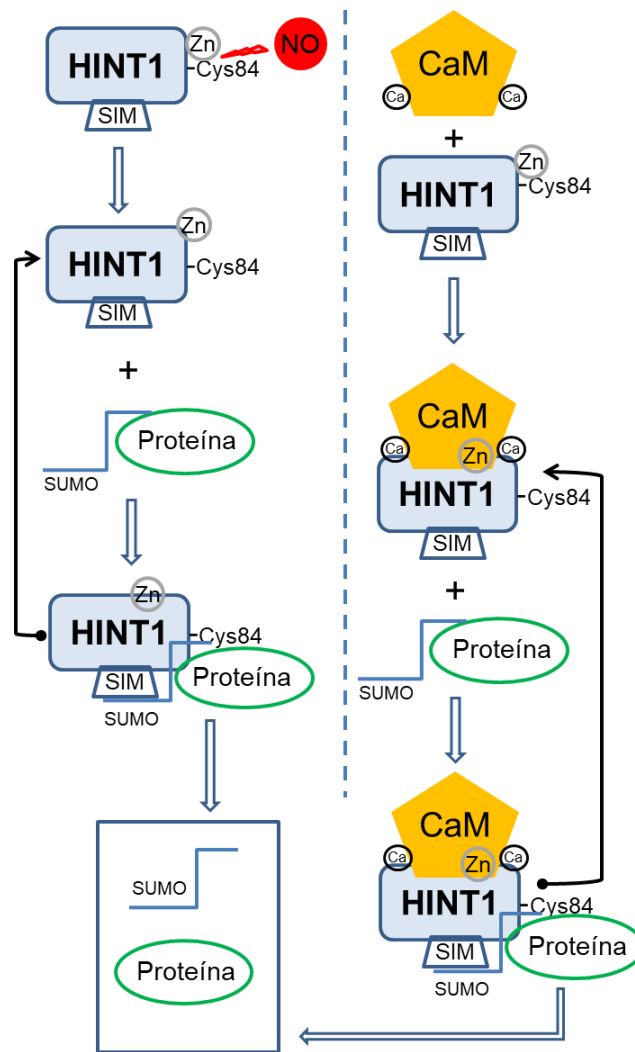


Figura 74. Regulación dual de la actividad sumoilasa de la HINT1. El NO produce la S-nitrosilación de los grupos tiol de las cisteínas y promueve la actividad isopeptidasa de la HINT1. La reducción de los grupos tioles de las cisteínas S-nitrosiladas evita que el zinc se una a la HINT1 e inhiba su actividad. La otra vía de regulación implica a la CaM-Ca²⁺, que libera a la HINT1 de su inhibición por zinc. La reducción en los niveles citoplasmáticos de calcio provoca la inactivación de la CaM, que se disocia de la HINT1. En esta situación, los iones de zinc pueden volver a unirse a la Cys84, bloqueando la actividad SUMO proteasa de la HINT1.

Las sumoilasas se caracterizan por poseer el dominio catalítico localizado habitualmente cerca del extremo carboxilo terminal. Tanto las SENPs como las DeSIs y la USLP1 poseen centros activos basados en una cisteína. Concretamente, el sitio catalítico de las DeSIs está constituido por una díada histidina-cisteína, mientras que los miembros de la familia SENP y la USLP1 presentan una tríada conservada de histidina-aspartico-cisteína (Barrett y Rawlings, 2001; Gillies y Hochstrasser, 2012; Schulz y col., 2012). Esta tríada está presente en numerosas cisteína-proteasas donde la cisteína es el

nucleófilo, la histidina es la base y el aspártico es el miembro ácido de la tríada, el cual establece un puente de hidrógeno con el residuo básico (Bullet y Townsend, 2013).

Nuestro estudio sugiere la analogía entre el sitio activo responsable de la actividad SUMO proteasa de la HINT1 con la organización catalítica de las otras SUMO proteasas. La capacidad del NO de promover la actividad de la HINT1 y, además, de rescatarla en presencia de zinc y otros iones metálicos divalentes indica que, al menos, una cisteína de las dos presentes en la HINT1 está implicada en su actividad catalítica. Los predictores señalan que la Cys84 es el único residuo susceptible de S-nitrosilación de la proteína HINT1 (Xue y col., 2010). La divergencia de actividad isopeptidasa entre los dos mutantes de la HINT1, C38S y C84S, confirmó cuál era la cisteína del centro catalítico. Mientras que el mutante C38S desumoiló los diferentes sustratos del estudio, la HINT1 C84S no mostró esta capacidad aún en presencia de los promotores Ca^{2+} -CaM o SNAP. Por tanto, la cisteína 84 forma parte del centro catalítico, ya que su mutación abole la actividad SUMO proteasa de la HINT1.

La estructura tridimensional de la HINT1 sugiere que su sitio catalítico está conformado por una tríada (His-Asp-Cys), a semejanza de las SENP y la USLP1 (Drag y Salvesen, 2008; Schulz y col., 2012). El modelo 3D mostró que el Asp87 se localiza cerca de la Cys84, y frente a estos dos residuos se encuentran las histidinas H112 y H114, aunque la última está más próxima a la cisteína 84.

La HINT1 presenta cierta homología con las metaloproteinasas de matriz (MMP) y las caspasas, en las cuales una cisteína clave del sitio catalítico tiene unido un átomo de zinc bloqueando su actividad enzimática; aquí también el NO es responsable de su activación (Tyagi y col., 1996; Nelson y Melendez, 2004). La disponibilidad del NO para S-nitrosilar a la cisteína de la MMP viene dada por la colocalización de la nNOS con la MMP (Gu y col., 2002). De forma similar, la HINT1 colocaliza con la nNOS en el entorno del MOR, donde la HINT1 se asocia con los complejos RGSZ2-nNOS (Guang y col., 2004). Cuando el MOR se activa, las subunidades $\text{G}\alpha$ -GTP se unen a la RGSZ2 asociada a la HINT1, provocando la activación de la nNOS con la consecuente producción de NO (Rodríguez-Muñoz y col., 2008; Sánchez-Blázquez y col., 2012). Por tanto, tal y como ocurre en la MMP, la proximidad de la nNOS facilita la eliminación de los iones de zinc de la cisteína 84 en centro catalítico de la HINT1.

El MOR establece interacciones físicas con los receptores ionotrópicos de NMDA (Rodríguez-Muñoz y col., 2015b), que activan a la CaM y a la nNOS. En este escenario, la CaM unida a la región N-terminal de la HINT1 retiraría los iones de zinc de la cisteína 84, disociando los complejos de la HINT1 con proteínas desumoiladas, como la RGSZ2 y el ICD de la teneurina 1. Así, la actividad de los NMDARs proveería del calcio y NO necesarios para la regulación de la actividad SUMO proteasa de la HINT1.

Estudios iniciales de la HINT1 sugirieron que la secuencia lineal que contiene el dominio HIT era el sitio de unión de zinc (Mozier y col., 1991). El análisis de la estructura dimérica tridimensional de la HINT1 redefinió la idea y se propusieron las histidinas H51, H112 y H114 como las candidatas más probables de unión del zinc (Lima y col., 1997). Estas tres histidinas están mutadas en pacientes con ARAN-NM. Mientras que las mutaciones H112N y H114R de la HINT1 carecen de actividad isopeptidasa, el mutante H51R posee actividad sumoilasa aunque desregulada, lo que sugiere que esta His51 es esencial para que el zinc inhiba la actividad de la HINT1. En las metaloenzimas, el zinc tiene una afinidad de picomolar a nanomolar cuando adopta una geometría tetraédrica coordinándose con el azufre de la cisteína, el nitrógeno de la histidina, y el oxígeno del aspartato o del glutamato (McCall y col., 2000). Sin embargo, la inhibición por zinc en la caspasa 3 se alcanza en un rango de nanomolar a micromolar bajo, proponiéndose que el Zn^{2+} se une a uno o a dos aminoácidos del sitio catalítico, probablemente la His237 y la Cys285 (Perry y col., 1997; Sulpizi y col., 2003). Estudios previos han indicado que un átomo de zinc se une a una molécula de HINT1 con una afinidad de 4,3 μ M (Mozier y col., 1991), lo que indica que el zinc inhibe la actividad sumoilasa de la HINT1 mediante su unión a una pareja de aminoácidos, posiblemente la cisteína 84 y la histidina 51. Por tanto, la tríada catalítica de la HINT1 estaría conformada por la cisteína 84 junto con el aspártico 87 y probablemente la histidina 114, siendo la histidina 51 clave para la inhibición por zinc.

La actividad hidrolasa de la proteína HINT1 sobre fosforamidatos y acil-adenilatos se reduce en presencia de cationes divalentes en el rango micromolar bajo, siendo su potencia de mayor a menor: $Cu^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} \geq Ni^{2+} > Mn^{2+}$. De forma similar, la actividad SUMO proteasa de la HINT1 se redujo en presencia de concentraciones equivalentes de estos cationes: $Cu^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+} > Mn^{2+}$. Por otra parte, TpAd y TpGc, sustrato e inhibidor sintéticos de la actividad hidrolasa de la proteína HINT1, respectivamente (Bardaweel y col., 2011; Bardaweel y col., 2012), antagonizaron su

actividad sumoilasa a concentraciones nanomolares. Estos resultados sugieren que ambas actividades enzimáticas comparten el sitio de reconocimiento del sustrato y/o el dominio catalítico en la HINT1.

La capacidad de la HINT1 para hidrolizar nucleótidos se reduce significativamente al mutar la histidina 114. Sin embargo, esta actividad se mantiene cuando se muta cualquiera de las dos cisteínas presentes en su secuencia (C38A ó C84A), aunque, sorprendentemente, el doble mutante de las cisteínas exhibe una décima parte de la actividad hidrolasa de la HINT1 WT (Ozga y col., 2010). Por tanto, la actividad hidrolasa de la HINT1 necesitaría la integridad de la His114, pero no dependería de la Cys84, como sí ocurre con la actividad isopeptidasa. Hasta la fecha, no se ha descrito la regulación por calcio, CaM o procesos redox de la actividad hidrolasa de la HINT1 sobre fosforamidatos y acil-adenilatos. La afinidad del zinc por la proteína HINT1 está en el rango de concentración micromolar bajo, similar al requerido para inhibir su actividad adenilato hidrolasa (Mozier y col., 1991; Shah y col., 2017). Es posible que ciertos procedimientos de purificación proteica eliminen al zinc que pudiera acompañar a la HINT1, liberando así su actividad enzimática.

El mutante H112N de la HINT1 carece tanto de actividad isopeptidasa como hidrolasa; no obstante, este mutante mantiene la capacidad de la HINT1 WT para promover la apoptosis mediada por p53 cuando se expresa en las células SW480 y en las MCF-7 (Weiske y Huber, 2006). Esto sugiere que algunas funciones de la HINT1 como proteína de señalización serían independientes de su actividad enzimática. Otra posibilidad es que rutinariamente su actividad enzimática deba bloquearse para promover otros procesos de su señalización, y allí coincidirían el tipo salvaje y, al menos, el mutante H112N.

La HINT1 establece asociaciones dependientes de zinc con proteínas tales como la PKC γ y la Raf-1, e interacciones dependientes de calcio con el σ 1R, la RGSZ2 y el ICD de la teneurina 1, que podrían afectar a su actividad SUMO proteasa (Rodríguez-Muñoz y col., 2015b; Rodríguez-Muñoz y col., 2011; Cortés-Montero y col., 2019). Nuestros estudios *in vitro* revelaron que la región citosólica de la subunidad NR1 del NMDAR, así como el σ 1R, abolen la actividad isopeptidasa de la HINT1. Sin embargo, esta actividad persiste cuando la HINT1 se asocia con el MOR, la RGSZ2 y el ICD de la teneurina 1. El estudio *ex vivo* confirmó que la HINT1 se une al MOR (Rodríguez-Muñoz y col., 2015b), y que el σ 1R o el receptor de NMDA bloquean el acceso de la HINT1 a su sustrato, la

RGSZ2 sumoilada. La administración *in vivo* de antagonistas del σ 1R, como el S1RA o el BD1063, y del agonista NMDA del NMDAR facilitaron la asociación de la RGSZ2 sumoilada con los complejos MOR-HINT1 y, probablemente, favorecieron la actividad isopeptidasa de la HINT1.

Estas observaciones y los datos de estudios previos nos ayudan a proponer la posible regulación de la actividad SUMO proteasa de la HINT1 en la membrana neural. En estado de reposo, la HINT1 está unida a la región carboxilo terminal del MOR (Guang y col., 2004). En esta situación, la HINT1 puede servir de puente con las subunidades NR1 de los NMDARs inactivos, además de asociarse con el σ 1R, o formar complejos con la RGSZ2 desumoilada y la PKC γ inactiva (Ajit y col., 2007; Rodríguez-Muñoz y col., 2015a). En el segundo escenario, la acción de la nNOS/NO sobre el CDR de la RGSZ2 proporciona iones de zinc que permiten el acoplamiento de la PKC γ inactiva con la HINT1 (Rodríguez-Muñoz y col., 2008; Garzón y col., 2011). La activación del MOR por un agonista promueve la separación de la PKC γ del complejo MOR-HINT1-RGSZ2 y la activación de la quinasa por la vía G $\beta\gamma$ -fosfolipasa C β -calcio/diacilglicerol. La actividad de la PKC γ en este entorno libera a la RGSZ2-nNOS del complejo MOR-HINT1, que ahora sí puede asociarse con las subunidades NR1 para regular la actividad de los receptores de glutamato NMDA. La activación directa de los NMDARs o los antagonistas del σ 1R promueven la separación de los receptores de NMDA activos de los complejos MOR-HINT1 (Rodríguez-Muñoz y col., 2015b; Rodríguez-Muñoz y col., 2012). En este escenario, la HINT1 se une a la RGSZ2 sumoilada, y los niveles de calcio elevados resultantes de la actividad del NMDAR permiten la activación de la CaM y de la nNOS/NO, las cuales ahora reclutan la actividad isopeptidasa de la HINT1. Por tanto, la Ca²⁺-CaM y el NO se oponen a la inhibición de la HINT1 causada por los iones de zinc unidos a su cisteína 84. Cuando cesa la actividad del NMDAR, los niveles de calcio citoplasmáticos bajan y, en consecuencia, también lo hace la actividad de la CaM y de la nNOS, de modo que el Zn²⁺ puede retornar a la Cys84 de la HINT1 para inhibir de nuevo su actividad SUMO proteasa.

En resumen, la actividad sumoilasa de la HINT1 se inhibe por la unión de iones zinc a la cisteína 84 del centro catalítico y probablemente también a la histidina 51. Además, esta actividad de la HINT1 se bloquea por su interacción con otras proteínas, como los NMDARs y el σ 1R. Tras la disociación de estos complejos, la Ca²⁺-CaM y el NO eliminarían el Zn²⁺ unido a la Cys84, promoviendo la actividad SUMO proteasa de la

HINT1. Por tanto, los procesos redox y la asociación con ciertas proteínas de señalización serían los reguladores de esta nueva actividad de la proteína HINT1.

3. Caracterización de los mutantes de la HINT1 causantes de la ARAN-NM

La ARAN-NM es una variante infrecuente de neuropatía periférica hereditaria tipo Charcot-Marie-Tooth. Un estudio de Zimon y colaboradores (2012) relacionó mutaciones puntuales recesivas del gen *HINT1* con esta enfermedad rara, cuyos pacientes se localizan principalmente en países del centro o sureste de Europa y Turquía (Peeters y col., 2017). Hasta la fecha se han descrito 15 mutaciones de la proteína HINT1 causantes de la ARAN-NM (Zimon y col., 2012; Lassuthová y col., 2015; Rauchenzauner y col., 2016; Meng y col., 2018; Wang y col., 2019). Nuestro estudio revela que la actividad SUMO proteasa se encuentra alterada en los mutantes humanos de la HINT1. Asimismo, estos mutantes establecen asociaciones anómalas con otras proteínas de señalización como la CaM, que regula la actividad isopeptidasa de la HINT1; la RGSZ2 y el ICD de la teneurina 1, que se unen a la HINT1 para su transporte desde la membrana plasmática hasta el núcleo; los receptores MOR y NMDAR, ambos regulados por HINT1; y el $\sigma 1R$, que junto con la HINT1 coordina la regulación cruzada entre ciertos GPCRs y el NMDAR (Rodríguez-Muñoz y col., 2011; Rodríguez-Muñoz y col., 2015b).

Con excepciones puntuales, los mutantes de la HINT1 causantes de la ARAN-NM se acoplaron débilmente con las proteínas analizadas en comparación con la HINT1 WT. Al ser la HINT1 una proteína muy conservada en la filogenia y con participación en diversos procesos fisiológicos tanto en la membrana plasmática como en el citosol y el núcleo, sus mutaciones pueden alterar significativamente ciertas rutas de señalización celulares.

Como hemos descrito, la CaM promueve la actividad SUMO proteasa de la HINT1 al liberar zinc de su unión a la cisteína 84. El acoplamiento de la CaM se realiza en la región amino terminal de la HINT1, concretamente en la secuencia 12–31 (QPGGDTIFGKIIRKEIPAKI), observándose que la CaM no se asocia con la mutación no humana T17A y, consecuentemente, no promueve su actividad isopeptidasa. Sin embargo, el NO alcanza su objetivo en la HINT1 T17A, el complejo zinc-Cys84 y promueve la actividad SUMO proteasa. Como se ha mencionado, todos los mutantes de la HINT1 conocidos y causantes de la ARAN-NM carecen de actividad sumoilasa o ésta está desregulada y, además, la mayoría de ellos interaccionan débilmente con la CaM y el

SUMO1. Sólo algunos mutantes humanos de la HINT1 como R37P, G93D, H112N y W123* manifiestan cambios en su actividad fosforamidasasa o en la formación de dímeros en ensayos *in vitro* (Shah y col., 2018).

En nuestro análisis, observamos que las mutaciones de la HINT1 están distribuidas en dos regiones arbitrarias dentro de la secuencia: la primera zona incluye desde la F33S a la K57N, y la segunda desde la mutación C84R a la W123*. Algunas de las mutaciones de la primera región muestran actividad SUMO proteasa, aunque desregulada, mientras que todas las mutaciones del segundo grupo carecen de ella. La segunda región contiene el núcleo catalítico Cys84-Asp87-His114, además de la secuencia conservada HIT que se alterna con los aminoácidos hidrofóbicos del dominio SIM (110-116, HIHLHVL).

En la cara citosólica de la membrana plasmática la HINT1 se une a la secuencia C-terminal del MOR, así como al dominio C1 de la subunidad NR1 del receptor glutamatérgico NMDA (Rodríguez-Muñoz y col., 2011; Rodríguez-Muñoz y col., 2015a). La CaM, el σ 1R y la HINT1 compiten para unirse a la región C0-C1-C2 de la NR1, de modo que la unión del σ 1R incrementa el tiempo de apertura del canal de calcio del receptor NMDA (promueve su actividad), mientras que la HINT1 y, sobre todo la Ca^{2+} -CaM, la reducen (Ehlers y col., 1996; Rodríguez-Muñoz y col., 2015a). La HINT1 y el σ 1R establecen una relación funcional estrecha que permite la regulación cruzada entre el MOR y el NMDAR (Rodríguez-Muñoz y col., 2015b). De hecho, en los ratones deficientes de la HINT1 o el σ 1R se debilita la comunicación entre ambos receptores; así la morfina no recluta la función del NMDAR y la activación directa del receptor de glutamato no reduce la analgesia de morfina (Rodríguez-Muñoz y col., 2011; Rodríguez-Muñoz y col., 2015a). Nuestro estudio indica que, excepto un par de mutaciones (G89V y C38R), los mutantes humanos de la HINT1 apenas se unen al σ 1R, al MOR y a la subunidad NR1 del NMDAR. La regulación del receptor de glutamato de NMDA por la HINT1 podría ser relevante para el desarrollo de la ARAN-NM. En este contexto, los mutantes humanos de la HINT1 modificarían las interacciones del NMDAR con otras proteínas de señalización, contribuyendo a la aparición de trastornos neurológicos, incluyendo enfermedades neurodegenerativas (Lipton, 2006) y, probablemente, alteraciones en la coordinación motora. De hecho, la progresión de la ELA se retrasa con el riluzol y la gaciclidina, dos fármacos que reducen la actividad de los NMDARs (Lu y col., 2016).

El ICD de la teneurina 1 y la HINT1 colaboran en la regulación de la expresión génica, por lo que la alteración de la actividad SUMO proteasa que muestran los mutantes humanos de la HINT1 podría afectar a la actividad transcripcional controlada por el ICD de la teneurina 1, y así contribuir a la aparición de la ARAN-NM en humanos. La asociación de la HINT1 con el ICD de la teneurina 1 y el $\sigma 1R$ es relevante para el correcto funcionamiento de las vías dopaminérgicas motoras. En mamíferos, la familia de las teneurinas engloba a 4 miembros (Ten 1-4) (Kenzelmann y col., 2007). La teneurina 1, que está además implicada en la enfermedad de Alzheimer, es una glicoproteína que se expresa abundantemente en el SNC de los mamíferos, donde participa en procesos como la ruta transcripcional de Wnt/ β -catenina, el crecimiento de las neuritas, la orientación del axón y la sinaptogénesis (Young y col., 2009; Bastías-Candía y col., 2015). Las dos teneurinas presentes en *Drosophila*, Ten-m y Ten-a, regulan la organización sináptica neuromuscular, formándose complejos *in vivo* entre la Ten-a presináptica neural y la Ten-m postsináptica muscular (Mosca y col., 2012). La expresión elevada de Ten-m regula la innervación específica de los músculos por determinadas motoneuronas. Este proceso está modulado por la Ten-m, que establece asociaciones homofílicas y colabora con otras proteínas para instaurar una correcta conectividad neuromuscular. Alteraciones pre- o postsinápticas de las teneurinas provocan graves pérdidas de sinapsis y perturban muchos de los elementos de la organización trans-sináptica. Además, ciertas mutaciones en la teneurina 4 se han asociado en humanos con el síndrome del temblor esencial (Hor y col., 2015). De hecho, los ratones KO de teneurina 4 exhiben un fenotipo “tembloroso”. Esta proteína regula la diferenciación de los oligodendrocitos y juega un papel fundamental en la mielinización de los axones de pequeño diámetro en el SNC (Suzuki y col., 2012). Por otro lado, alteraciones en la teneurina 1 se consideran potencialmente patogénicas en la parálisis cerebral, un conjunto heterogéneo de trastornos donde están afectados la postura y el movimiento (McMichael y col., 2015).

La RGSZ2 se ha relacionado con diferentes tipos de cáncer, entre ellos el de pulmón, el de próstata, el ovárico, de mama, el carcinoma hepatocelular y el colorrectal (Bodley y col., 2013; Hayes y Roman, 2016). Sin embargo, no hay datos que asocien la sumoilación de la RGSZ2 con estas enfermedades. La mayoría de las mutaciones humanas de la HINT1 apenas interactuaron con las diferentes proteínas de señalización del estudio. Sin embargo, este patrón no se observó en sus interacciones con la RGSZ2. En este caso, la mitad de los mutantes se unió más fuertemente y la otra mitad presentó la tendencia

contraria. La RGSZ2 y el ICD de la teneurina 1 actúan como factores de transcripción en el núcleo, donde se asocian con la HINT1 (Bodle y col., 2013; Scholer y col., 2015). En este compartimento, las perturbaciones en los complejos HINT1-RGSZ2 ó HINT1-ICD de la teneurina 1, junto con la alteración de la actividad isopeptidasa de la HINT1, podrían afectar a la función de estas proteínas en el núcleo, desregulando la expresión de ciertos genes en los que puede estar el origen de la fisiopatología de la ARAN-NM.

El $\sigma 1R$ es una proteína transmembrana presente principalmente en el retículo endoplásmico, aunque también se localiza en la membrana plasmática y en la envoltura nuclear (Hayashi y Su, 2003; Navarro y col., 2010; Pal y col., 2012; Sánchez-Blázquez y col., 2014; Tsai y col., 2015). El $\sigma 1R$ está enriquecido en motoneuronas, y sus mutaciones autosómicas recesivas con pérdida de función se han asociado con neuropatías motoras distales hereditarias, e incluso con la ELA/demencia frontotemporal (Maylyutov y col., 2010; Al-Saif y col., 2011; Rossor y col., 2012). En este sentido, el mutante E102Q del $\sigma 1R$ causa la ELA juvenil. Este mutante E102Q del $\sigma 1R$ se caracteriza por agregarse rápidamente y acumularse en el retículo endoplásmico y en compartimentos celulares asociados, provocando alteraciones en la degradación proteasomal y en la homeostasis del calcio en las células transfectadas (Dresser y col., 2017). Recientemente se ha descrito que la mutación E102Q del $\sigma 1R$ modifica sus interacciones con otras proteínas de señalización, que ahora presentan una pobre respuesta a ligandos del $\sigma 1R$ y al calcio intracelular (Rodríguez-Muñoz y col., 2020). Además, los ratones KO del $\sigma 1R$ manifiestan una degeneración anómala de sus motoneuronas, y la ausencia de este receptor en los ratones G93A-SOD1, un modelo animal de ELA, exacerba la progresión de esta patología (Bernard-Marissal y col., 2015). En animales sanos, la HINT1 no establece fuertes interacciones con el $\sigma 1R$, pero ambas proteínas cooperan en mantener a ciertos GPCRs bajo la regulación del NMDAR (Rodríguez-Muñoz y col., 2015b). Dada la alta expresión del $\sigma 1R$ en las motoneuronas y su relación funcional con la HINT1, las mutaciones en cualquiera de estas dos proteínas podrían alterar varias rutas fisiológicas, desencadenando patologías neuromotoras.

Como ya se ha mencionado previamente, la eliminación del gen *HINT1* no promueve fenotipos neuropáticos ni alteraciones motoras, al menos en ratones (Seburn y col., 2014), por lo que en su ausencia las funciones de la HINT1 serían sustituidas de forma eficiente por otras proteínas. Los pacientes de la ARAN-NM presentan unos niveles del ARNm de la HINT1 en linfoblastos comparables a los de los individuos sanos. Sin embargo, en

estos mismos pacientes apenas se detectan niveles significativos de la proteína HINT1 mutada, ya que es rápidamente metabolizada por el proteasoma (Zimon y col., 2012), lo que revela que estas mutaciones de la HINT1 comprometen la viabilidad celular. Estos datos sugieren que las alteraciones funcionales causadas por los mutantes humanos de la HINT1 comprometen principalmente a las motoneuronas. No obstante, la destrucción continuada de la HINT1 mutada no impide el daño celular que causa su acumulación, hasta que finalmente se desencadena la enfermedad motora. En este caso, un bloqueo temprano de la expresión de los mutantes de la HINT1 podría reducir los signos de la ARAN-NM. Es interesante destacar que algunos estudios recientes señalan el potencial terapéutico de los reguladores exógenos de la HINT1 para tratar a nivel clínico tanto el dolor agudo como el neuropático (Garzón y col., 2015; Shah y col., 2019). Por tanto, se debería valorar el empleo de estas intervenciones farmacológicas para aliviar los síntomas de la ARAN-NM.

Podríamos concluir que la alta conservación de la HINT1 a lo largo de la filogenia sugiere su importante relevancia biológica. Todos los mutantes de la HINT1 causantes de la ARAN-NM establecen asociaciones anómalas con otras proteínas de señalización que regulan o son reguladas por la HINT1 WT en las neuronas. Así, en ausencia de estas interacciones proteicas, los mutantes de la HINT1 parecen acumularse provocando daño celular. Estos resultados sugieren que el papel de la HINT1 en la patogénesis de esta enfermedad podría relacionarse con la alteración de las rutas de señalización en las que la HINT1 está implicada en las motoneuronas.

4. Asociaciones de las regiones citosólicas de los TRPs

Este estudio *in vitro* muestra la interacción física de la HINT1, el σ 1R y la CaM con los dominios amino y carboxilo terminales de los receptores TRPV1, TRPA1 y TRPM8, así como la influencia de los niveles de calcio sobre éstas. Este catión regula las uniones del σ 1R con la proteína BiP en el retículo endoplásmico, con la subunidad NR1 del NMDAR en la membrana plasmática (Hayashi y Su, 2007; Rodríguez-Muñoz y col., 2015a) y en este estudio observamos que el calcio también aumenta la asociación σ 1R-TRPs. El aumento de la concentración de calcio siempre promueve la interacción del σ 1R con otras proteínas de señalización, mientras que su eliminación las reduce. Basándonos en estas observaciones, el calcio emerge como el principal regulador fisiológico conocido

de la actividad del σ 1R. Además, las interacciones del σ 1R también se modulan por moléculas endógenas, como los esteroides, la N,N-dimetiltriptamina, la esfingosina y la ceramida monoglicosilada, entre otras (Hayashi, 2015).

Tal y como se ha descrito para el NMDAR, la CaM activada por calcio reduce la permeación de iones a través de los canales TRPs. Las regiones citosólicas de los TRPs que observamos unen CaM coinciden con las zonas previamente indicadas mediante ensayos de eliminación de secuencia y mutaciones (Numazaki y col., 2003; Rosenbaum y col., 2004; Sarria y col., 2011; Hasan y col., 2017). Los sitios de unión de la CaM a la subunidad NR1 C1 se solapan con los del σ 1R (Rodríguez-Muñoz y col., 2015b). Nuestros resultados también sugieren que un fenómeno similar ocurre en las regiones N- y C-terminales del TRPV1, así como en el extremo amino terminal del TRPA1 y del TRPM8. Una observación de interés es que la zona carboxilo terminal del TRPA1 une CaM incluso en ausencia de calcio, aunque este catión aumenta esta asociación. Un aspecto muy particular del TRPA1 Ct es que, en este dominio, la unión de la CaM se incrementa por la unión del σ 1R; es, por tanto, un fenómeno de alosterismo positivo. Puesto que aquí, a diferencia de lo observado para el TRPA1 Nt y los otros TRPs estudiados, la CaM y el σ 1R no compiten entre ellos, es probable que el sitio de unión de la CaM se localice próximo al del σ 1R. Estudios previos sugieren un papel regulador dual de la CaM sobre la función del TRPA1; así, las bajas concentraciones de calcio promueven la unión de la CaM a su C-terminal potenciando la permeación de calcio a través del canal; sin embargo, cuando los niveles de calcio alcanzan un cierto umbral, la CaM, probablemente unida al extremo N-terminal del canal, desensibiliza al TRPA1 (Hasan y col., 2017).

De forma similar al σ 1R, el ATP/fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) también previene el efecto inhibitorio de la CaM sobre la permeación catiónica del TRPV1 (Lishko y col., 2007). No obstante, no se ha determinado si ambos reguladores, σ 1R y PIP2, comparten su lugar de unión sobre el TRPV1. Con la excepción de lo mencionado para el TRPA1 Ct, la unión del σ 1R a estos TRPs redujo la asociación de la CaM a las concentraciones de calcio fisiológicas (3 mM). En un sistema análogo, el σ 1R también se opone al efecto inhibitorio de la CaM sobre la actividad del NMDAR (Rodríguez-Muñoz y col., 2015b), por lo que en los TRPs podría operar un mecanismo similar. Así, la unión del σ 1R a los TRPs favorecería la apertura del canal, mientras que la CaM reduciría la actividad de éstos, compitiendo y reduciendo la asociación del σ 1R. Por tanto, la

actividad resultante de los canales TRPs dependería de la concentración de ambos reguladores, CaM y σ 1R, en su entorno citosólico.

Los ligandos de carácter antagonista reducen la unión del σ 1R al NMDAR y, por consiguiente, promueven la unión de la CaM a la subunidad NR1 C1 inhibiéndose así la permeación de calcio a través del receptor de glutamato (Rodríguez-Muñoz y col., 2015b). En lo que concierne a los TRPs, la administración *in vivo* de los antagonistas del σ 1R, BD1063 o progesterona, reduce la expresión del TRPV1 en las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal (Ortiz-Rentería y col., 2018). Este tratamiento parece perturbar el equilibrio entre la unión de la CaM y el σ 1R al TRPV1, potenciando una inhibición anómala del TRPV1 mediada por la CaM que conllevara su eliminación de la membrana plasmática.

Nuestros resultados demuestran la unión de la CaM, el σ 1R y la HINT1 a las regiones citosólicas de los TRPs seleccionados. Sin embargo, la organización estructural de estos canales genera una serie de interrogantes acerca del modo en el que la CaM regula su función. Los TRPs son homotetrámeros y, en general, sus dominios terminales citosólicos contienen sitios de unión de la CaM. Es necesario llevar a cabo más estudios que nos permitan conocer si la unión de la CaM a un único sitio del canal es suficiente para inhibir la actividad de éste o, como ciertos estudios sugieren, que el grado de inhibición dependa del número de sitios a los cuales la CaM esté unida (Rosenbaum y col., 2004). Además, queda por determinar si la CaM asociada a la región N-terminal colabora con la unida al C-terminal, o si cada una juega su papel independientemente.

La HINT1 y el σ 1R están ampliamente distribuidos en diferentes tejidos y en la mayoría de los compartimentos celulares (Hayashi y Su, 2007; Liu y col., 2008). En la membrana plasmática, la HINT1 interactúa con los extremos C-terminales de varios GPCR, entre ellos el MOR y el receptor CB1 (Guang y col., 2004; Sánchez-Blázquez y col., 2014). El σ 1R también se acopla a los GPCRs y regula la actividad del MOR (Sánchez-Blázquez y col., 2012; Rodríguez-Muñoz y col., 2015b). La HINT1 se une a los extremos amino terminales de los TRPs seleccionados, aunque esta asociación depende moderadamente de calcio. Mientras que los complejos HINT1-NMDAR y HINT1-TRPA1 Nt se pierden por la unión del σ 1R, las interacciones de la HINT1 con los canales TRPV1/M8 no se afectan por la unión del σ 1R. Estas observaciones son compatibles con una posible influencia de la señalización del MOR, y otros GPCRs, sobre la actividad de los TRPs. Como se ha descrito en el apartado anterior, la HINT1 establece una serie de

asociaciones con proteínas de señalización, algunas dependientes de zinc y de procesos redox (Ajit y col., 2007; Rodríguez-Muñoz y Garzón, 2013). Por ello, las interacciones HINT1-TRPs conectarían a estos canales con distintas rutas de señalización de la membrana. Además, estas uniones podrían influenciar diferentes mecanismos nucleares, donde la HINT1 ejerce su actividad anti-tumoral y se asocia con factores de transcripción (Weiske y Huber, 2005; Schöler y col., 2015).

La farmacología del σ 1R es compleja, ya que los ligandos exógenos producen distintos efectos dependiendo del sistema en el que se estudian (Maurice y Su, 2009). Si la proteína asociada al σ 1R es el BiP, un ligando puede promover la separación de su unión, pero si el σ 1R estuviese acoplado a la NR1 C1, entonces el mismo ligando la puede fortalecer. En ambas situaciones, este ligando compite con otros que ejercen el efecto opuesto, fortalecer el complejo σ 1R-BiP y reducir el σ 1R-NR1 C1. Actualmente, al σ 1R se le considera una chaperona regulada por ligando. Los investigadores no han determinado de forma clara si los ligandos del σ 1R son agonistas o antagonistas cuando promueven ciertos efectos mediados por el propio σ 1R, como efectos neuroprotectores o anti-convulsivantes (Rodríguez-Muñoz y col., 2018; Sánchez-Blázquez y col., 2018). Por tanto, los efectos moduladores de los ligandos del σ 1R en las interacciones de esta chaperona son impredecibles cuando se trata de estudiar nuevas asociaciones del σ 1R. En este contexto, el presente estudio confirmó las distintas actividades de los ligandos del σ 1R regulando sus interacciones con los dominios citosólicos del TRPV1, TRPA1 y TRPM8.

Como se ha mencionado previamente, esta característica se observó inicialmente para las interacciones del σ 1R con la NR1C1 y el BiP, donde los efectos de los ligandos son completamente opuestos. Los denominados agonistas disocian los complejos σ 1R-BiP y los antagonistas previenen el efecto de los agonistas. Sin embargo, los antagonistas rompen el acoplamiento σ 1R-NR1 C1 y los agonistas se oponen al efecto separador de los antagonistas. La asociación del σ 1R con las regiones citosólicas del TRPV1, TRPA1 y TRPM8 sigue este patrón complejo de regulación, de modo que el efecto exhibido por los ligandos del σ 1R varía en función del canal e incluso del dominio citosólico considerado.

Basándonos en la literatura y en los datos de este estudio, podemos sugerir la existencia de, al menos, tres tipos de interacciones del σ 1R con otras proteínas. El primero corresponde a la regulación de la analgesia del MOR por el σ 1R, en la que el NMDAR juega un papel esencial (Garzón y col., 2012; Rodríguez-Muñoz y col., 2015b).

Este patrón se reproduce en las asociaciones del σ 1R con el N-terminal del TRPM8 y el extremo carboxilo del TRPV1, donde los antagonistas separan los complejos σ 1R-TRP y los agonistas los promueven. En este caso, el σ 1R y la CaM compiten en su unión al canal TRP. El segundo tipo de interacción sigue el modelo de asociación del σ 1R con el BiP en el retículo endoplásmico (Hayashi y Su, 2007). Este patrón se observa en las regiones N-terminales del TRPV1 y TRPA1; en ellas los agonistas del σ 1R reducen la unión de la chaperona al canal, mientras que los antagonistas refuerzan o no modifican las interacciones entre el σ 1R y el TRP. En este modelo, el σ 1R y la CaM también compiten en su interacción con el TRP. Por último, en la tercera categoría tanto los agonistas como los antagonistas del σ 1R minimizan su unión con el dominio carboxilo terminal del TRPA1.

En general, los efectos de los diferentes ligandos en las interacciones del σ 1R con sus proteínas diana son similares a los descritos para los agonistas de la mayoría de los GPCRs, lo que se conoce como “agonismo sesgado”. Este fenómeno es típico de ligandos exógenos, aunque algunos estudios han descrito cierta preferencia de ruta de señalización de los GPCRs para algunos ligandos endógenos como, por ejemplo, opioides endógenos y el MOR (Thompson y col., 2015). Ciertos ligandos de los GPCR activan preferentemente a estos GPCRs cuando están acoplados a determinadas proteínas G. Esta situación se ha caracterizado para la clonidina y agonistas del MOR y del DOR (Sánchez-Blázquez y col., 1999; Sánchez-Blázquez y col., 2001); la afinidad que manifiestan los agonistas opioides depende de la clase de proteína G que esté asociada al MOR (Garzón y col., 1998). Es llamativo el hecho de que estos agonistas con preferencia por unos complejos GPCR-proteína G determinados también sean capaces de unirse a otras combinaciones, pero sin originar ninguna ruta de señalización. Por tanto, los opioides “agonistas sesgados” del MOR también actúan como antagonistas frente a los efectos de otros agonistas cuando los primeros se unen a las combinaciones MOR-proteína G sobre las que son inactivos (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1988; Garzón y col., 1994). De este modo, en el campo de los GPCRs, y concretamente en el MOR, se ha demostrado que los ligandos pueden comportarse como agonistas sesgados e incluso como antagonistas dependiendo del tipo de proteína G que esté acoplada al receptor opioide.

La situación descrita para los GPCR y las proteínas G se puede comparar con los resultados del σ 1R y sus interacciones con otras proteínas de señalización. Las proteínas G que interactúan con los GPCRs determinan la actividad agonista/antagonista de los

ligandos. De la misma manera, las diferentes proteínas de señalización que se asocian con el σ 1R definen la actividad de un ligando determinado, es decir, disociación o estabilización del complejo. Por tanto, el σ 1R se podría comparar con los GPCR, y las proteínas interactuantes BiP, NR1 C1 y los dominios citosólicos de los TRPs, tendrían el mismo papel que las diferentes proteínas G, Gi, Go, Gz, Gq, etc. La conformación del MOR varía en función de la proteína G acoplada (Garzón y col., 1998), por lo que el σ 1R debería adoptar distinta estructura en función de si se une a la NR1 C1, al BiP o al extremo C-terminal del TRPA1. En consecuencia, no se debería esperar que un mismo ligando del σ 1R ejerza un efecto similar en todos los canales TRPs, sino que su actividad va a depender tanto del canal estudiado como de la región citosólica analizada.

Se ha involucrado a los TRPs en multitud de actividades fisiológicas. En los nervios periféricos, en los ganglios y en la sustancia gelatinosa del asta dorsal de la médula espinal, la activación de los canales TRPs por diferentes agentes contribuye a la percepción dolorosa y a la aparición de la alodinia. La expresión de ciertos TRPs en las áreas supraespinales sugiere su participación en otros procesos aún no definidos. Además, habría que explorar cuál es el papel específico de la HINT1 modulando los canales TRPV1 y TRPM8. Se ha propuesto que el MOR y el TRPV1 podrían estar conectados (Ortiz-Rentería y col., 2018), lo que sugiere que el tándem HINT1- σ 1R estaría implicado en la conexión de los GPCRs con canales de calcio, como los TRPs, como ya se ha visto para los complejos GPCR-NMDAR. Además, los ligandos del σ 1R exhiben una actividad sesgada al regular las interacciones del σ 1R con diferentes proteínas de señalización, lo que debería aprovecharse para desarrollar fármacos específicos para diferentes patologías.

5. Asociación del TRPA1 con el MOR y el NMDAR: papel de la CaM

Los resultados obtenidos sugieren una relación entre los canales de calcio TRPA1 y el glutamatérgico NMDAR. Ambos canales catiónicos participan en la génesis de señales resultantes de estímulos nocivos, y están asociados con los receptores opioides, como el MOR.

En un primer momento, el canal TRPA1 se clonó desde fibroblastos pulmonares fetales, aunque también está expresado en otras células no neuronales, incluyendo queratinocitos, melanocitos, mastocitos, odontoblastos, células enterocromafines y células β de los islotes de Langerhans (Nilius y col., 2012; Mickle y col., 2015; Gouin y col.,

2017). Además, el TRPA1 se encuentra en las neuronas periféricas sensoriales y, concretamente, se expresa en las neuronas peptidérgicas TRPV1⁺ murinas (Story y col., 2003). En el asta dorsal de la médula espinal, el canal TRPA1 de los terminales centrales de estas fibras nerviosas aferentes regula la transmisión de la señal hacia neuronas glutamatérgicas e interneuronas GABAérgicas (Jordt y col., 2004; Kobayashi y col., 2005; Nagata y col., 2005). Asimismo, el TRPA1 está presente en ciertas regiones del SNC, tales como la corteza somatosensorial, el hipocampo, el bulbo raquídeo y la médula espinal (Kim y col., 2010; Kunert-Keil y col., 2006; Tani y col., 2015; Kheradpezhough y col., 2017).

Nuestro estudio identificó la presencia del TRPA1 en la fracción sinaptosomal de la corteza frontal murina, el PAG, el bulbo, la médula espinal y los DRG, donde el MOR también se expresa. La coprecipitación del TRPA1 con el MOR sugiere una relación funcional entre el canal nociceptor y este GPCR antinociceptivo. Con el MOR también se asocian los receptores de NMDA a través de su subunidad NR1 con el segmento C1 (Rodríguez-Muñoz y col., 2012). En el caso del complejo MOR-NMDAR, la interacción está regulada por las proteínas HINT1 y σ 1R, el cual compite con la CaM por unirse a la subunidad NR1 (Ehlers y col., 1996; Rodríguez-Muñoz y col., 2015a; Rodríguez-Muñoz y col., 2015b). La activación del MOR recluta la actividad de los NMDARs, que ejercen un efecto negativo sobre la señalización de este GPCR. Este mecanismo de regulación aparece tras dosis altas de opioides que apenas promueven la internalización del MOR, como la morfina (Garzón y col., 2012).

En estado basal, la asociación del MOR con el NMDAR eleva el umbral para la activación directa del receptor de glutamato y facilita su reclutamiento en respuesta a la señalización del MOR (Rodríguez-Muñoz y col., 2012; Garzón y col., 2012; Rodríguez-Muñoz y col., 2011). El complejo MOR-NMDAR es posible gracias al tándem HINT1- σ 1R y, de hecho, en ausencia de alguna de estas dos proteínas la asociación entre ambos receptores se reduce notablemente (Vicente-Sánchez y col., 2013; Rodríguez-Muñoz y col., 2015b). Sin embargo, el TRPA1 no se acopla con el MOR o el NMDAR vía HINT1 y/o σ 1R; en este sentido, las asociaciones TRPA1-MOR o TRPA1-NR1 se mantienen en las fracciones P2 neurales obtenidas de ratones HINT1^{-/-} y σ 1R^{-/-} (Cortés-Montero y col., 2020).

En ensayos *in vitro*, la CaM promovió el acoplamiento de las regiones N- y C-terminales del TRPA1 con el MOR y la subunidad NR1 del NMDAR. El TRPA1 une a la

HINT1, al σ 1R y a la CaM por su zona amino terminal, y únicamente al σ 1R y a la CaM por su extremo carboxilo. La CaM se asocia al TRPA1 Ct en ausencia de calcio, si bien este catión potencia esta interacción. Además, el σ 1R compite con la CaM en su unión al TRPA1 Nt, pero la asociación CaM-TRPA1 Ct se favorece por el σ 1R. La regulación de la actividad del TRPA1 por la CaM parece ser compleja, ya que la CaM interviene tanto en la potenciación como en la inactivación del canal dependientes de calcio. El TRPA1 contiene un dominio no canónico de unión a CaM en su región carboxilo terminal, mientras que su zona Nt exhibe una asociación más débil con la CaM, pese a ser una secuencia crítica para la desensibilización del TRPA1 inducida por calcio (Cordero-Morales y col., 2011; Hasan y col., 2017). El dominio de unión a CaM del N-terminal del TRPA1 está próximo al dominio conector y la hélice pre-S1, dos regiones estructuralmente cercanas al dominio de unión a CaM del TRPA1 Ct (Nagata y col., 2005). Por tanto, la topología de los sitios de interacción del TRPA1 con la CaM permitiría el acoplamiento simultáneo de la CaM a este canal TRP y a las regiones citosólicas del MOR y de la NR1.

El MOR se acopla al receptor NMDA y al TRPA1 en situación basal, y la activación del receptor opioide por morfina administrada por vía icv reduce la asociación MOR-NMDAR (Rodríguez-Muñoz y col., 2015), pero reforzó el complejo MOR-TRPA1 a nivel supraespinal pero no en médula. Estas diferencias entre estructuras cerebrales pueden deberse a que la morfina inyectada icv apenas alcanza los MORs de la médula.

La morfina inyectada por vía ip produjo el efecto opuesto, reduciendo la asociación MOR-TRPA1 en la corteza cerebral pero no en médula espinal. La morfina administrada por vía sistémica cruza la barrera hematoencefálica, pero actúa principalmente a niveles periféricos y espinales (DeLander y col., 1984). Los MOR se localizan en el asta dorsal de la médula espinal, concretamente en la sustancia gelatinosa, así como en los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales (localizados en los DRG), en los terminales centrales en la superficie del asta dorsal y en los terminales periféricos en los tejidos (Coggeshall y col., 1997; Truong y col., 2003). No obstante, la morfina por vía ip no alteró la asociación TRPA1-MOR en la médula espinal, y la reducción de estos complejos en la corteza podría deberse a los MORs localizados en las neuronas sensoriales que alcanzan áreas superiores a través de la neuromodulación de las vías ascendentes.

Los receptores NMDA activados por el MOR participan en la regulación negativa que reduce la señalización opioide; sin embargo, no hay evidencias que indiquen que los

canales TRPA1 activados jueguen el mismo papel que los NMDARs sobre el MOR. El receptor de glutamato metabotrópico de tipo 5 (mGluR5) aumenta la sensibilidad del TRPA1 mediante la actividad de las quinasas PKA y PKC, que fosforilan residuos específicos de este canal (Brackley y col., 2017). De forma similar, los receptores B2 de bradiquinina y los PAR2 también estimulan la función del TRPA1, probablemente por la vía Gq/G11-PLC-PKC (Dai y col., 2007; Maher y col., 2011). Los residuos diana de la PKA, PKC y Cdk5 en el TRPA1 no se localizan en los sitios de unión a CaM (Brackley y col., 2017; Meents y col., 2017; Sulak y col., 2018), por lo que estas fosforilaciones no interferirían con la asociación de la CaM o las uniones mediadas por la CaM del canal con terceras proteínas. En este escenario, los MORs podrían oponerse a los canales TRPA1, ya que estos GPCRs inhiben la excitabilidad de las neuronas sensoriales (Stein y col., 2009), si bien la actividad del MOR también podría contribuir a la del TRPA1 vía PKA, PKC y Cdk5 (Garzón y col., 2012). Los resultados de nuestro estudio no permiten discernir los mecanismos subyacentes a la relación existente entre el MOR y el canal TRPA1, pero sí abren nuevas vías para diseñar las aproximaciones metodológicas que permitan profundizar en estos procesos.

Los NMDARs se localizan en las fibras nociceptivas aferentes primarias cutáneas y en los ganglios trigeminales (Carlton y col., 1995; Coggeshall y col., 1998; Kindelin y col., 2000; Lee y col., 2007). Aproximadamente el 47% de los axones periféricos no mielinizados son inmunopositivos para NMDARs, y se cree que estos receptores están involucrados en la transmisión sináptica entre las neuronas aferentes primarias y las del asta dorsal (Gerber y col., 1989; Momiyama y col., 2000). Los receptores de NMDA juegan un papel fundamental en la sensibilización central en las neuronas espinales, y en la liberación de neurotransmisores específicos desde los terminales periféricos y centrales de las fibras sensoriales durante la transmisión dolorosa (McRoberts y col., 2001). Por tanto, los NMDARs estarían implicados en sistemas nociceptivos divergentes (Kristensen y col., 1994). La activación del MOR o directamente la del NMDAR por la administración icv del NMDA reduce la asociación MOR-NR1 (Rodríguez-Muñoz y col., 2012). Estas situaciones reclutan quinasas como la PKA, la PKC y la CaMKII, que fosforilan residuos citosólicos del MOR, lo cual ejerce un efecto negativo en la señalización opioide y separa los complejos MOR-NMDAR (Garzón y col., 2012). La unión de la CaM activada por calcio a la NR1 reduce la probabilidad de apertura del canal del NMDAR, mientras que la fosforilación de la región citosólica de la NR1 por la PKC y

la PKA bloquea el acceso a la CaM, promoviendo así la unión del $\sigma 1R$ y la actividad del receptor de glutamato (Ehlers y col., 1996; Rodríguez-Muñoz y col., 2015a).

La interacción del canal TRPA1 con el MOR y el NMDAR parece mediar por la CaM. La administración supraespinal de NMDA aumentó la asociación MOR-TRPA1 a nivel cortical y espinal, mientras que reforzó o debilitó la formación de los complejos NMDAR-TRPA1 en corteza y médula espinal, respectivamente. Los NMDARs activados por NMDA aumentan los niveles intracelulares de calcio y, por tanto, podrían potenciar la unión de los canales TRPA1 supraespinales con los otros dos receptores del estudio vía Ca^{2+} -CaM. Este mecanismo, mediante la modulación de las vías descendentes, afectaría en la médula espinal a las asociaciones del TRPA1 con el MOR y el NMDAR en direcciones opuestas. La formalina también estimuló la formación de complejos entre el TRPA1 y los receptores MOR y NMDA particularmente en la médula espinal, y provocó una notable reducción en la asociación MOR-NMDAR en los DRG, a un nivel comparable al que produjo el CCI en la médula espinal, el bulbo raquídeo y el PAG (Sánchez-Blázquez y col., 2013). Estos cambios moleculares estarían mediados por la actividad de los NMDARs; de hecho, los antagonistas del NMDAR atenúan el dolor inducido por la formalina, lo que sugiere que el TRPA1 necesita al receptor glutamatérgico para propagar la señal nociceptiva (Kristensen y col., 1994). La activación vía icv o ip del MOR también tuvo reflejo en la asociación TRPA1-NMDAR, probablemente al reclutarse el receptor de glutamato por el opioide (Rodríguez-Muñoz y col., 2012; Rodríguez-Muñoz y col., 2015a). En este sentido la administración icv de morfina redujo la asociación del TRPA1 con el NMDAR a nivel cortical y espinal, mientras que la morfina ip reforzó esta asociación en la corteza cerebral.

Las interacciones del TRPA1 con estas proteínas de señalización se modificaron en la misma dirección en el modelo CCI de dolor neuropático. Así, la alodinia mecánica causada por el CCI redujo la asociación del TRPA1 con el MOR y el NMDAR. Además, en este modelo de neuropatía se ha descrito la ruptura del complejo MOR-NMDAR (Sánchez-Blázquez y col., 2013). Por tanto, las respuestas adaptativas a la hiperactividad sostenida del NMDAR (CCI) responsable de la sensibilización del sistema nervioso difieren de aquellas que subyacen a intervenciones farmacológicas agudas o al dolor inflamatorio inducido por la formalina.

En su conjunto, esta parte del trabajo muestra la asociación de los canales TRPA1 con el MOR y el NMDAR en diferentes áreas del sistema nervioso, así como la

plasticidad de estas interacciones en respuesta a diferentes fármacos y modelos de dolor inflamatorio y neuropático. La finalidad de este estudio no fue profundizar en los mecanismos subyacentes a estos cambios observados, sino documentar la posibilidad de la asociación del TRPA1 con receptores de glutamato NMDA y opioides tipo Mu. Las aproximaciones utilizadas nos permiten comprender la relación del TRPA1 con otras proteínas de señalización relevantes en la percepción dolorosa.

En resumen, los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran que los ratones KO de la HINT1 presentan un comportamiento alterado, y que cumple los requisitos para ser utilizado como un modelo animal para el estudio del trastorno bipolar humano, tanto a nivel de ensayo de posibles fármacos como para la identificación de nuevas dianas terapéuticas. A nivel molecular, hemos caracterizado la actividad SUMO proteasa de la HINT1, que se recluta por el NO y Ca^{2+} -CaM y que se regula por su interacción con diferentes proteínas de señalización. Los mutantes humanos de la HINT1 causantes de la ARAN-NM muestran una actividad sumoilasa alterada, además de establecer asociaciones anómalas con otras proteínas del sistema nervioso. La asociación de la HINT1 junto con el $\sigma 1\text{R}$ y la CaM a los canales TRPs abre la posibilidad de que los GPCRs, a través de estas proteínas, establezcan regulaciones cruzadas con estos canales. Este estudio supone un avance significativo hacia el mejor entendimiento del papel de la HINT1 en el sistema nervioso, pudiendo ser de gran utilidad para mejorar el tratamiento de las conductas maniacas, del trastorno bipolar y de la ARAN-NM. Además, el TRPA1 coprecipita con el MOR y el NMDAR en varias estructuras del sistema nervioso y estas asociaciones responde a diferentes intervenciones farmacológicas y modelos de dolor. Estos resultados abren nuevas vías de investigación para analizar el papel del TRPA1 en la nocicepción.

Conclusiones

1. Mediante una serie de pruebas conductuales hemos identificado en los ratones carentes de la proteína HINT1 un fenotipo bipolar que presenta cierta semejanza con el descrito en humanos. Estos animales manifiestan de forma espontánea un comportamiento “maniaco” que, en respuesta a determinadas situaciones estresantes, cede su lugar a conductas de tipo depresivo. Por consiguiente, la deficiencia en la proteína HINT1 proporcionaría un modelo animal que reproduce las diferentes facetas del trastorno bipolar humano.
2. En este sentido, fármacos que se emplean en el tratamiento del trastorno bipolar normalizaron el comportamiento de los ratones deficientes en la HINT1. Además, los antagonistas del $\sigma 1R$ redujeron los síntomas de los animales del modelo maniaco sin alterar la conducta de los animales control, por lo que serían potencialmente útiles para mitigar este trastorno en humanos.
3. A nivel molecular, los ratones carentes de la HINT1 presentan alteraciones en las fosforilaciones reguladoras de la quinasa GSK3 β , así como una mayor actividad de la PKC y un enriquecimiento en subunidades NR2B en los receptores de NMDA. La combinación de estas anomalías conduce al desequilibrio entre las fases de LTP y LTD sinápticas, responsables del funcionamiento cerebral normal, predominando la fase de LTD en los animales KO de la HINT1.
4. Mediante ensayos *in vitro* con proteínas recombinantes hemos identificado la actividad SUMO proteasa de la HINT1, cuyo núcleo catalítico está constituido por la tríada Cys84-Asp87-His114. La HINT1 presenta un sitio SIM de interacción con SUMO en el que sus aminoácidos se alternan con los del motivo HIT, y un dominio de unión de CaM en su extremo amino terminal. La HINT1 es capaz de eliminar el SUMO tanto de proteínas con las que se asocia, como la RGSZ2 o el ICD de la teneurina 1, como de proteínas con las que no establece complejos estables, como la RanGAP1.
5. La actividad sumoilasa de la HINT1 está regulada por el NO y por la CaM activada por calcio. Ambas moléculas son capaces de eliminar el bloqueo por el catión divalente zinc de la cisteína del centro catalítico de la HINT1. El NO promueve la S-nitrosilación del grupo tiol de la cisteína 84, impidiendo la reasociación del complejo zinc-cisteína hasta la regeneración por la S-nitrosoglutatión reductasa o el sistema de la tioredoxina del grupo tiol. La CaM secuestra los iones de zinc de la HINT1 liberando así su centro catalítico que, tras la salida de la CaM, volvería rápidamente a ser bloqueado por zinc.

- La HINT1 es la primera SUMO proteasa descrita cuya actividad está regulada por iones zinc, CaM y procesos redox.
6. Las asociaciones que la HINT1 establece a nivel fisiológico con otras proteínas de señalización influyen en su actividad isopeptidasa. Así, la subunidad NR1 C1 del NMDAR y el σ 1R inhiben la actividad SUMO proteasa de la HINT1. La administración *in vivo* de antagonistas del σ 1R, como el S1RA o el BD1063, y del agonista NMDA del NMDAR promueven la asociación de la RGSZ2 sumoilada con los complejos MOR-HINT1, posiblemente, para su desumoilación mediante la actividad isopeptidasa de la HINT1.
 7. Los mutantes de la HINT1 causantes de la ARAN-NM presentan una actividad isopeptidasa anómala; la mayoría de estos mutantes han perdido esta función enzimática, mientras que otros retienen cierta actividad, pero totalmente desregulada. Los mutantes humanos de la HINT1 también exhiben un patrón alterado de unión a otras proteínas de señalización, tanto a la CaM como al SUMO, así como a los receptores de membrana MOR, NMDAR y σ 1R, además de a la RGSZ2 y al ICD de la teneurina 1. Nuestros resultados sugieren que las mutaciones humanas de la HINT1 alteran una serie de rutas de señalización celular, de las que algunas serían críticas para la función de las vías motoras.
 8. Nuestro estudio ha demostrado la interacción física de la HINT1, el σ 1R y la CaM con los dominios amino y carboxilo terminales de los receptores TRPV1, TRPA1 y TRPM8, así como la dependencia de estas uniones de los niveles de calcio. Las regiones citosólicas de cada canal muestran ciertas diferencias en la unión y competencia entre estas proteínas de señalización, lo que nos sugiere que los TRPs responden de forma diferente ante los mismos niveles de estos reguladores.
 9. El efecto de los ligandos del σ 1R modulando sus interacciones con los TRPs depende tanto del canal estudiado como de la región citosólica analizada. Este hallazgo junto a lo conocido para las interacciones σ 1R-NR1 y σ 1R-BiP nos revela que el comportamiento de los ligandos del σ 1R está sesgado en función de la proteína unida a este receptor. Por tanto, las diferentes proteínas de señalización con las que se asocia el σ 1R condicionan el tipo de unión y la actividad de un ligando determinado, es decir, que se produzca la disociación o estabilización del complejo.

10. Los canales TRPA1 coprecipitan con los receptores MOR y NMDA en diferentes estructuras del sistema nervioso. Los complejos TRPA1-MOR y TRPA1-NMDAR responden a diversas intervenciones farmacológicas y a modelos de dolor inflamatorio y neuropático. La CaM promueve el acoplamiento de las regiones citosólicas del TRPA1 con el MOR y la subunidad NR1 del NMDAR.

Nuestro estudio ha profundizado en la fisiología de proteínas como la HINT1 y el σ 1R, así como en su posible papel en ciertas patologías. Aunque nuestro estudio se ciñó al SN, ambas proteínas están también presentes en otros tejidos. En el caso de la HINT1, hemos descrito su actividad SUMO proteasa, así como su interacción con diferentes proteínas de señalización. El hecho de que ambas características de la HINT1 estén alteradas en los mutantes humanos causantes de la ARAN-NM nos sugiere que su desregulación produce el daño celular. Esta idea se sustenta por la rápida destrucción de estas proteínas en células de humanos que sufren ARAN-NM, y por el hecho de que la carencia de la HINT1 no promueve la aparición de esta enfermedad. Por tanto, el bloqueo temprano de la expresión de estos mutantes podría minimizar el deterioro motor, así como su progresión. En lo relativo al σ 1R, la regulación farmacológica de esta chaperona despierta mucho interés en áreas como el control de la alodinia presente en muchas neuropatías. El conocimiento de la actividad sesgada de sus ligandos puede orientar su diseño frente a dianas terapéuticas al tiempo que se reducen interacciones no deseadas.

Bibliografía

- Abrial, E., Etievant, A., Bétry, C., Scarna, H., Lucas, G., Haddjeri, N. y Lambás-Señas, L. (2013). Protein kinase C regulates mood-related behaviors and adult hippocampal cell proliferation in rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 43, 40–48.
- Ahel, I., Rass, U., El-Khamisy, S. F., Katyal, S., Clements, P. M., McKinnon, P. J. y col. (2006). The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature*, 443(7112), 713–716.
- Ahern, G. P., Brooks, I. M., Miyares, R. L. y Wang, X.-b. (2005). Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. *J Neurosci.*, 25(21), 5109–5116.
- Aicher, S. A., Goldberg, A., Sharma, S. y Pickel, V. M. (2000). Mu-opioid receptors are present in vagal afferents and their dendritic targets in the medial nucleus tractus solitarius. *J.Comp Neurol.*, 422(2), 181–190.
- Ajit, S. K., Ramineni, S., Edris, W., Hunt, R. A., Hum, W.-T., Hepler, J. R. y Young, K. H. (2007). RGSZ1 interacts with protein kinase C interacting protein PKCI-1 and modulates mu opioid receptor signaling. *Cell. signal.*, 19(4), 723–730.
- Akil, H., Owens, C., Gutstein, H., Taylor, L., Curran, E. y Watson, S. (1998). Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alcohol Depend.*, 51(1-2), 127–140.
- Akopian, A. N., Ruparel, N. B., Jeske, N. A. y Hargreaves, K. M. (2007). Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. *J. Physiol.*, 583(Pt 1), 175–193.
- Al Chawaf, A., St Amant, K., Belsham, D. y Lovejoy, D. A. (2007). Regulation of neurite growth in immortalized mouse hypothalamic neurons and rat hippocampal primary cultures by teneurin C-terminal-associated peptide-1. *Neuroscience*, 144(4), 1241–1254.
- Albert, P. R. y Robillard, L. (2002). G protein specificity: traffic direction required. *Cell. signal.*, 14(5), 407–418.
- Al-Diwani, A., Handel, A., Townsend, L., Pollak, T., Leite, M. I., Harrison, P. J. y col. (2019). The psychopathology of NMDAR-antibody encephalitis in adults: a systematic review and phenotypic analysis of individual patient data. *The Lancet Psychiatry*, 6(3), 235–246.
- Almendra, L., Laranjeira, F., Fernández-Marmiesse, A. y Negrão, L. (2018). SIGMAR1 gene mutation causing Distal Hereditary Motor Neuropathy in a Portuguese family. *Acta Myol.*, 37(1), 2–4.
- Al-Saif, A., Al-Mohanna, F., y Bohlega, S. (2011). A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, 70(6), 913–919.
- Ammelburg, M., Frickey, T. y Lupas, A. N. (2006). Classification of AAA+ proteins. *J. Struct. Biol.*, 156(1), 2–11.
- Anand, U., Otto, W. R., Facer, P., Zebda, N., Selmer, I., Gunthorpe, M. J. y col. (2008). TRPA1 receptor localisation in the human peripheral nervous system and functional studies in cultured human and rat sensory neurons. *Neurosci. Lett.*, 438(2), 221–227.

Anderson, K. A., Wang, D. y Hirsche, M. D. (2013). HINT2 and fatty liver disease: mitochondrial protein hyperacetylation gives a hint? *Hepatology*, 57(5), 1681–1683.

Andersson, D. A., Gentry, C., Alenmyr, L., Killander, D., Lewis, S. E., Andersson, A. y col. (2011). TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol. *Nat. Commun.*, 2, 551.

Andrade, E. L., Meotti, F. C. y Calixto, J. B. (2012). TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacol. Ther.*, 133(2), 189–204.

Arden, J. R., Segredo, V., Wang, Z., Lamah, J. y Sadée, W. (1995). Phosphorylation and agonist-specific intracellular trafficking of an epitope-tagged mu-opioid receptor expressed in HEK 293 cells. *J. Neurochem.*, 65(4), 1636–1645.

Arvidsson, U., Riedl, M., Chakrabarti, S., Lee, J. H., Nakano, A. H., Dado, R. J. y col. (1995). Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *J. Neurosci.*, 15(5 Pt 1), 3328–3341.

Ataman, Z. A., Gakhar, L., Sorensen, B. R., Hell, J. W. y Shea, M. A. (2007). The NMDA receptor NR1 C1 region bound to calmodulin: structural insights into functional differences between homologous domains. *Structure*, 15(12), 1603–1617.

Axelsson, H. E., Minde, J. K., Sonesson, A., Toolanen, G., Högestätt, E. D. y Zygmunt, P. M. (2009). Transient receptor potential vanilloid 1, vanilloid 2 and melastatin 8 immunoreactive nerve fibers in human skin from individuals with and without Norrbottnian congenital insensitivity to pain. *Neuroscience*, 162(4), 1322–1332.

Bagutti, C., Forro, G., Ferralli, J., Rubin, B. y Chiquet-Ehrismann, R. (2003). The intracellular domain of teneurin-2 has a nuclear function and represses zic-1-mediated transcription. *J. Cell. Sci.*, 116(Pt 14), 2957–2966.

Bail, S. y Kiledjian, M. (2008). DcpS, a general modulator of cap-binding protein-dependent processes? *RNA biology*, 5(4), 216–219.

Bandell, M., Story, G. M., Hwang, S. W., Viswanath, V., Eid, S. R., Petrus, M. J. y col. (2004). Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*, 41(6), 849–857.

Baraldi, P. G., Preti, D., Materazzi, S. y Geppetti, P. (2010). Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel as emerging target for novel analgesics and anti-inflammatory agents. *J. Med. Chem.*, 53(14), 5085–5107.

Barbier, E. y Wang, J. B. (2009). Anti-depressant and anxiolytic like behaviors in PKCI/HINT1 knockout mice associated with elevated plasma corticosterone level. *BMC Neurosci.*, 10, 132.

Barbier, E., Zapata, A., Oh, E., Liu, Q., Zhu, F., Undie, A. y col. (2007). Supersensitivity to amphetamine in protein kinase-C interacting protein/HINT1 knockout mice. *Neuropsychopharmacology*, 32(8), 1774–1782.

- Bardaweel, S. K., Ghosh, B. y Wagner, C. R. (2012). Synthesis and evaluation of potential inhibitors of human and *Escherichia coli* histidine triad nucleotide binding proteins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22(1), 558–560.
- Bardaweel, S., Ghosh, B., Chou, T.-F., Sadowsky, M. J. y Wagner, C. R. (2011). *E. coli* histidine triad nucleotide binding protein 1 (ecHinT) is a catalytic regulator of D-alanine dehydrogenase (DadA) activity in vivo. *PloS one*, 6(7), e20897.
- Baron, M. (2001). Genetics of schizophrenia and the new millennium: progress and pitfalls. *Am. J. Hum. Genet.*, 68(2), 299–312.
- Barrett, A. J. y Rawlings, N. D. (2001). Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol. Chem.*, 382(5), 727–733.
- Barrière, D. A., Mallet, C., Blomgren, A., Simonsen, C., Daulhac, L., Libert, F. y col. (2013). Fatty acid amide hydrolase-dependent generation of antinociceptive drug metabolites acting on TRPV1 in the brain. *PloS one*, 8(8), e70690.
- Bastías-Candia, S., Braidy, N., Zolezzi, J. M. y Inestrosa, N. C. (2015). Teneurins and Alzheimer's disease: a suggestive role for a unique family of proteins. *Med. Hypotheses*, 84(4), 402–407.
- Bauer, A., Huber, O. y Kemler, R. (1998). Pontin52, an interaction partner of beta-catenin, binds to the TATA box binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(25), 14787–14792.
- Bautista, D. M., Jordt, S.-E., Nikai, T., Tsuruda, P. R., Read, A. J., Poblete, J. y col. (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*, 124(6), 1269–1282.
- Bautista, D. M., Pellegrino, M. y Tsunozaki, M. (2013). TRPA1: A gatekeeper for inflammation. *Annu. Rev. Physiol.*, 75, 181–200.
- Beck, B., Bidaux, G., Bavencoffe, A., Lemonnier, L., Thebault, S., Shuba, Y. y col. (2007). Prospects for prostate cancer imaging and therapy using high-affinity TRPM8 activators. *Cell calcium*, 41(3), 285–294.
- Behrendt, H.-J., Germann, T., Gillen, C., Hatt, H. y Jostock, R. (2004). Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *Br. J. Pharmacol.*, 141(4), 737–745.
- Bellono, N. W., Kammel, L. G., Zimmerman, A. L. y Oancea, E. (2013). UV light phototransduction activates transient receptor potential A1 ion channels in human melanocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110(6), 2383–2388.
- Ben-Johny, M., Dick, I. E., Sang, L., Limpitikul, W. B., Kang, P. W., Niu, J., y col. (2015). Towards a Unified Theory of Calmodulin Regulation (Calmodulation) of Voltage-Gated Calcium and Sodium Channels. *Curr. Mol. Pharmacol.*, 8(2), 188–205.
- Bennett, G. J. y Xie, Y.-K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33(1), 87–107.

- Berman, D. M., Kozasa, T. y Gilman, A. G. (1996). The GTPase-activating protein RGS4 stabilizes the transition state for nucleotide hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, 271(44), 27209–27212.
- Bernard-Marissal, N., Médard, J.-J., Azzedine, H. y Chrast, R. (2015). Dysfunction in endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk underlies SIGMAR1 loss of function mediated motor neuron degeneration. *Brain*, 138(Pt 4), 875–890.
- Bessac, B. F. y Jordt, S.-E. (2008). Breathtaking TRP channels: TRPA1 and TRPV1 in airway chemosensation and reflex control. *Physiology*, 23, 360–370.
- Bevan, S. y Winter, J. (1995). Nerve growth factor (NGF) differentially regulates the chemosensitivity of adult rat cultured sensory neurons. *J. Neurosci.*, 15(7 Pt 1), 4918–4926.
- Bhat, R. V., Shanley, J., Correll, M. P., Fieles, W. E., Keith, R. A., Scott, C. W. y Lee, C. M. (2000). Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97(20), 11074–11079.
- Bhattacharya, A., Scott, B. P., Nasser, N., Ao, H., Maher, M. P., Dubin, A. E. y col. (2007). Pharmacology and antitussive efficacy of 4-(3-trifluoromethyl-pyridin-2-yl)-piperazine-1-carboxylic acid (5-trifluoromethyl-pyridin-2-yl)-amide (JNJ17203212), a transient receptor potential vanilloid 1 antagonist in guinea pigs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 323(2), 665–674.
- Bhave, G., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D. J., Oxford, G. S. y Gereau, R. W. (2002). cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron*, 35(4), 721–731.
- Bieganowski, P., Garrison, P. N., Hodawadekar, S. C., Faye, G., Barnes, L. D. y Brenner, C. (2002). Adenosine monophosphoramidase activity of Hint and Hnt1 supports function of Kin28, Ccl1, and Tfb3. *J. Biol. Chem.*, 277(13), 10852–10860.
- Birnboim, H. C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6), 1513–1523.
- Bödding, M., Wissenbach, U. y Flockerzi, V. (2007). Characterisation of TRPM8 as a pharmacophore receptor. *Cell calcium*, 42(6), 618–628.
- Bodle, C. R., Mackie, D. I. y Roman, D. L. (2013). RGS17: an emerging therapeutic target for lung and prostate cancers. *Future Med. Chem.*, 5(9), 995–1007.
- Bölcskei, K., Helyes, Z., Szabó, Á., Sándor, K., Elekes, K., Németh, J. y col. (2005). Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain*, 117(3), 368–376.
- Bonnot, A., Corio, M., Tramu, G. y Viala, D. (1996). Immunocytochemical distribution of ionotropic glutamate receptor subunits in the spinal cord of the rabbit. *J. Chem. Neuroanat.*, 11(4), 267–278.

- Boucard, A. A., Maxeiner, S. y Südhof, T. C. (2014). Latrophilins function as heterophilic cell-adhesion molecules by binding to teneurins: regulation by alternative splicing. *J. Biol. Chem.*, 289(1), 387–402.
- Boyce-Rustay, J. M. y Holmes, A. (2006). Genetic inactivation of the NMDA receptor NR2A subunit has anxiolytic- and antidepressant-like effects in mice. *Neuropsychopharmacology*, 31(11), 2405–2414.
- Brackley, A. D., Gomez, R., Guerrero, K. A., Akopian, A. N., Glucksman, M. J., Du, J. y col. (2017). A-Kinase Anchoring Protein 79/150 Scaffolds Transient Receptor Potential A 1 Phosphorylation and Sensitization by Metabotropic Glutamate Receptor Activation. *Sci. Rep.*, 7(1), 1842.
- Brauchi, S., Orta, G., Salazar, M., Rosenmann, E. y Latorre, R. (2006). A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J. Neurosci*, 26(18), 4835–4840.
- Brenner, C. (2002). Hint, Fhit, and GalT: function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases. *Biochemistry*, 41(29), 9003–9014.
- Brenner, C., Garrison, P., Gilmour, J., Peisach, D., Ringe, D., Petsko, G. A. y Lowenstein, J. M. (1997). Crystal structures of HINT demonstrate that histidine triad proteins are GalT-related nucleotide-binding proteins. *Nat. Struct. Biol.*, 4(3), 231–238.
- Brierley, S. M., Hughes, P. A., Page, A. J., Kwan, K. Y., Martin, C. M., O'Donnell, T. A. y col. (2009). The ion channel TRPA1 is required for normal mechanosensation and is modulated by algogenic stimuli. *Gastroenterology*, 137(6), 2084–2095.e3.
- Brigman, J. L., Wright, T., Talani, G., Prasad-Mulcare, S., Jinde, S., Seabold, G. K. y col. (2010). Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning. *The J. Neurosci.*, 30(13), 4590–4600.
- Bron, R., Klesse, L. J., Shah, K., Parada, L. F. y Winter, J. (2003). Activation of Ras is necessary and sufficient for upregulation of vanilloid receptor type 1 in sensory neurons by neurotrophic factors. *Mol. Cell. Neurosci.*, 22(1), 118–132.
- Brzoska, P. M., Chen, H., Levin, N. A., Kuo, W. L., Collins, C., Fu, K. K. y col. (1996). Cloning, mapping, and in vivo localization of a human member of the PKCI-1 protein family (PRKCNH1). *Genomics*, 36(1), 151–156.
- Buller, A. R. y Townsend, C. A. (2013). Intrinsic evolutionary constraints on protease structure, enzyme acylation, and the identity of the catalytic triad. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110(8), E653–E661.
- Camprubí-Robles, M., Planells-Cases, R. y Ferrer-Montiel, A. (2009). Differential contribution of SNARE-dependent exocytosis to inflammatory potentiation of TRPV1 in nociceptors. *FASEB J.*, 23(11), 3722–3733.

Carlson, M. L., Wilson, E. T. y Prescott, S. M. (2003). Regulation of COX-2 transcription in a colon cancer cell line by Pontin52/TIP49a. *Mol. Cancer*, 2, 42.

Carlton, S. M., Hargett, G. L. y Coggeshall, R. E. (1995). Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Neurosci Lett.*, 197(1), 25–28.

Castanas, E., Giraud, P., Bourhim, N., Cantau, P. y Oliver, C. (1984). Kappa 3: a novel subtype of the kappa opioid site in bovine adrenal medulla, highly selective for Met-enkephalin-Arg6-Phe7. *Neuropeptides*, 5(1-3), 133–136.

Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K. R. y col. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288(5464), 306–313.

Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. y Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816–824.

Cavanaugh, D. J., Chesler, A. T., Jackson, A. C., Sigal, Y. M., Yamanaka, H., Grant, R. y col. (2011). Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J. Neurosci.*, 31(13), 5067–5077.

Cen, B., Li, H. y Weinstein, I. B. (2009). Histidine triad nucleotide-binding protein 1 up-regulates cellular levels of p27KIP1 by targeting ScfSKP2 ubiquitin ligase and Src. *J. Biol. Chem.*, 284(8), 5265–5276.

Chan, J. S., Chiu, T. T. y Wong, Y. H. (1995). Activation of type II adenylyl cyclase by the cloned mu-opioid receptor: coupling to multiple G proteins. *J. Neurochem.*, 65(6), 2682–2689.

Chapman, V., Haley, J. E. y Dickenson, A. H. (1994). Electrophysiologic analysis of preemptive effects of spinal opioids on N-methyl-D-aspartate receptor-mediated events. *Anesthesiology*, 81(6), 1429–1435.

Charrua, A., Cruz, C. D., Narayanan, S., Gharat, L., Gullapalli, S., Cruz, F. y Avelino, A. (2009). GRC-6211, a new oral specific TRPV1 antagonist, decreases bladder overactivity and noxious bladder input in cystitis animal models. *J. Urology*, 181(1), 379–386.

Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y. y col. (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*, 415(6873), 793–798.

Chazot, P. L. y Stephenson, F. A. (1997). Molecular dissection of native mammalian forebrain NMDA receptors containing the NR1 C2 exon: direct demonstration of NMDA receptors comprising NR1, NR2A, and NR2B subunits within the same complex. *J. Neurochem.*, 69(5), 2138–2144.

Chen, J., Li, L., Chen, S.-R., Chen, H., Xie, J.-D., Sirrieh, R. E. y col. (2018). The $\alpha 2\delta$ -1-NMDA Receptor Complex Is Critically Involved in Neuropathic Pain Development and Gabapentin Therapeutic Actions. *Cell reports*, 22(9), 2307–2321.

- Chen, L. y Huang, L. Y. (1991). Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a mu opioid. *Neuron*, 7(2), 319–326.
- Chen, Q., Wang, X., O'Neill, F. A., Walsh, D., Kendler, K. S. y Chen, X. (2008). Is the histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) gene a candidate for schizophrenia? *Schizophrenia research*, 106(2-3), 200–207.
- Chen, X., Wang, X., Hossain, S., O'Neill, F. A., Walsh, D., Pless, L. y col. (2006). Haplotypes spanning SPEC2, PDZ-GEF2 and ACSL6 genes are associated with schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.*, 15(22), 3329–3342.
- Chen, Y., Geis, C. y Sommer, C. (2008). Activation of TRPV1 contributes to morphine tolerance: involvement of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *The J. Neurosci.*, 28(22), 5836–5845.
- Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, J. A. y Yu, L. (1993). Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.*, 44(1), 8–12.
- Cheng, W., Sun, C. y Zheng, J. (2010). Heteromerization of TRP channel subunits: extending functional diversity. *Protein & cell*, 1(9), 802–810.
- Chou, T.-F., Baraniak, J., Kaczmarek, R., Zhou, X., Cheng, J., Ghosh, B. y Wagner, C. R. (2007a). Phosphoramidate pronucleotides: a comparison of the phosphoramidase substrate specificity of human and Escherichia coli histidine triad nucleotide binding proteins. *Mol. Pharmaceutics*, 4(2), 208–217.
- Chou, T.-F., Cheng, J., Tikh, I. B. y Wagner, C. R. (2007c). Evidence that human histidine triad nucleotide binding protein 3 (Hint3) is a distinct branch of the histidine triad (HIT) superfamily. *J. Mol. Biol.*, 373(4), 978–989.
- Chou, T.-F., Tikh, I. B., Horta, B. A., Ghosh, B., De Alencastro, R. B. y Wagner, C. R. (2007b). Engineered monomeric human histidine triad nucleotide-binding protein 1 hydrolyzes fluorogenic acyl-adenylate and lysyl-tRNA synthetase-generated lysyl-adenylate. *J. Biol. Chem.*, 282(20), 15137–15147.
- Clapham, D. E., Julius, D., Montell, C. y Schultz, G. (2005). International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol. Rev.*, 57(4), 427–450.
- Clark, J. A., Liu, L., Price, M., Hersh, B., Edelson, M. y Pasternak, G. W. (1989). Kappa opiate receptor multiplicity: evidence for two U50,488-sensitive kappa 1 subtypes and a novel kappa 3 subtype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 251(2), 461–468.
- Coggeshall, R. E. y Carlton, S. M. (1998). Ultrastructural analysis of NMDA, AMPA, and kainate receptors on unmyelinated and myelinated axons in the periphery. *J. Comp. Neurol.*, 391(1), 78–86.
- Coggeshall, R. E., Zhou, S. y Carlton, S. M. (1997). Opioid receptors on peripheral sensory axons. *Brain research*, 764(1-2), 126–132.

Colburn, R. W., Lubin, M. L., Stone, D. J., Wang, Y., Lawrence, D., D'Andrea, M. R. y col. (2007). Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron*, 54(3), 379–386.

Commons, K. G., van Bockstaele, E. J. y Pfaff, D. W. (1999). Frequent colocalization of mu opioid and NMDA-type glutamate receptors at postsynaptic sites in periaqueductal gray neurons. *J. Comp. Neurol.*, 408(4), 549–559.

Cordero-Morales, J. F., Gracheva, E. O. y Julius, D. (2011). Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108(46), E1184–E1191.

Cortés-Montero, E., Rodríguez-Muñoz, M., Ruiz-Cantero, M. D., Cobos, E. J., Sánchez-Blázquez, P. y Garzón-Niño, J. (2020). Calmodulin Supports TRPA1 Channel Association with Opioid Receptors and Glutamate NMDA Receptors in the Nervous Tissue. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(1).

Cortés-Montero, E., Rodríguez-Muñoz, M., Sánchez-Blázquez, P. y Garzón, J. (2019). The Axonal Motor Neuropathy-Related HINT1 Protein Is a Zinc- and Calmodulin-Regulated Cysteine SUMO Protease. *Antioxid. Redox Signal.*, 31(7), 503–520.

Coyle, J. T., Tsai, G. y Goff, D. (2003). Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1003, 318–327.

Cui, M., Honore, P., Zhong, C., Gauvin, D., Mikusa, J., Hernandez, G. y col. (2006). TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *J. Neurosci.*, 26(37), 9385–9393.

da Costa, D. S., Meotti, F. C., Andrade, E. L., Leal, P. C., Motta, E. M. y Calixto, J. B. (2010). The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain*, 148(3), 431–437.

Dai, Y., Wang, S., Tominaga, M., Yamamoto, S., Fukuoka, T., Higashi, T. y col. (2007). Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J. Clin. Invest.*, 117(7), 1979–1987.

Dalmau, J., Lancaster, E., Martinez-Hernandez, E., Rosenfeld, M. R. y Balice-Gordon, R. (2011). Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *The Lancet Neurology*, 10(1), 63–74.

Davis, J. B., Gray, J., Gunthorpe, M. J., Hatcher, J. P., Davey, P. T., Overend, P. y col. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, 405(6783), 183–187.

DeLander, G. E., Portoghese, P. S. y Takemori, A. E. (1984). Role of spinal mu opioid receptors in the development of morphine tolerance and dependence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 231(1), 91–96.

Delescluse, I., Mace, H. y Adcock, J. J. (2012). Inhibition of airway hyper-responsiveness by TRPV1 antagonists (SB-705498 and PF-04065463) in the unanaesthetized, ovalbumin-sensitized guinea pig. *Br. J. Pharmacol.*, 166(6), 1822–1832.

- Del'Guidice, T. y Beaulieu, J.-M. (2010). Psychotropic drugs and the involvement of the Akt/GSK3 signalling pathway in mental illnesses. *Med. Sci.*, 26(6-7), 647–651.
- DeMaria, C. D., Soong, T. W., Alseikhan, B. A., Alvania, R. S. y Yue, D. T. (2001). Calmodulin bifurcates the local Ca²⁺ signal that modulates P/Q-type Ca²⁺ channels. *Nature*, 411(6836), 484–489.
- Deutschenbaur, L., Beck, J., Kiyhankhadiv, A., Mühlhauser, M., Borgwardt, S., Walter, M. y col. (2016). Role of calcium, glutamate and NMDA in major depression and therapeutic application. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 64, 325–333.
- Díaz, J. L., Zamanillo, D., Corbera, J., Baeyens, J. M., Maldonado, R., Pericàs, M. A. y col. (2009). Selective sigma-1 (sigma1) receptor antagonists: emerging target for the treatment of neuropathic pain. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, 9(3), 172–183.
- Dingledine, R. y Conn, P. J. (2000). Peripheral glutamate receptors: molecular biology and role in taste sensation. *J. Nutr.*, 130(4S Suppl), 1039S–1042S.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. y Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.*, 51(1), 7–61.
- Diogenes, A., Akopian, A. N. y Hargreaves, K. M. (2007). NGF up-regulates TRPA1: implications for orofacial pain. *J. Dent. Res.*, 86(6), 550–555.
- Docherty, R. J., Yeats, J. C., Bevan, S. y Boddeke, H. W. (1996). Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflugers Arch.*, 431(6), 828–837.
- Doerner, J. F., Gisselmann, G., Hatt, H. y Wetzell, C. H. (2007). Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. *J. Biol. Chem.*, 282(18), 13180–13189.
- Dohrn, C. S. y Beitz, A. J. (1994). Differential NMDA NR1 mRNA expression among spinal trigeminal neurons that project to different targets. *Neuroreport*, 5(15), 1857–1860.
- Downes, G. B. y Gautam, N. (1999). The G protein subunit gene families. *Genomics*, 62(3), 544–552.
- Drag, M. y Salvesen, G. S. (2008). DeSUMOylating enzymes—SENPs. *IUBMB life*, 60(11), 734–742.
- Dreser, A., Vollrath, J. T., Sechi, A., Johann, S., Roos, A., Yamoah, A. y col. (2017). The ALS-linked E102Q mutation in Sigma receptor-1 leads to ER stress-mediated defects in protein homeostasis and dysregulation of RNA-binding proteins. *Cell Death Differ.*, 24(10), 1655–1671.
- Dwivedi, Y. y Pandey, G. N. (2008). Adenylyl cyclase-cyclicAMP signaling in mood disorders: role of the crucial phosphorylating enzyme protein kinase A. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, 4(1), 161–176.
- Egan, T. J., Acuña, M. A., Zenobi-Wong, M., Zeilhofer, H. U. y Urech, D. (2016). Effects of N-Glycosylation of the human cation channel TRPA1 on agonist-sensitivity. *Biosci. Rep.*, 36(5).

- Ehlers, M. D., Zhang, S., Bernhardt, J. P. y Huganir, R. L. (1996). Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell*, 84(5), 745–755.
- Eid, S. R. (2011). Therapeutic targeting of TRP channels—the TR(i)P to pain relief. *Curr. Top. Med. Chem.*, 11(17), 2118–2130.
- Einat, H. (2007). Establishment of a battery of simple models for facets of bipolar disorder: a practical approach to achieve increased validity, better screening and possible insights into endophenotypes of disease. *Behav. Genet.*, 37(1), 244–255.
- Einat, H. (2014). Partial effects of the protein kinase C inhibitor chelerythrine in a battery of tests for manic-like behavior in black Swiss mice. *Pharmacol. Rep.*, 66(4), 722–725.
- Elashoff, M., Higgs, B. W., Yolken, R. H., Knable, M. B., Weis, S., Webster, M. J., y col. (2007). Meta-analysis of 12 genomic studies in bipolar disorder. *J. Mol. Neurosci.*, 31(3), 221–243.
- Emir, T. L. (2017). Neurobiology of TRP Channels. 1–9.
- Ewald, R. C., Van Keuren-Jensen, K. R., Aizenman, C. D. y Cline, H. T. (2008). Roles of NR2A and NR2B in the development of dendritic arbor morphology in vivo. *J. Neurosci.*, 28(4), 850–861.
- Fernandes, E. S., Russell, F. A., Spina, D., McDougall, J. J., Graepel, R., Gentry, C. y col. (2011). A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor α -induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monarthritis. *Arthritis Rheum.*, 63(3), 819–829.
- Finn, A. K. y Whistler, J. L. (2001). Endocytosis of the mu opioid receptor reduces tolerance and a cellular hallmark of opiate withdrawal. *Neuron*, 32(5), 829–839.
- Fiorentini, C., Gardoni, F., Spano, P., Di Luca, M. y Missale, C. (2003). Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. Chem.*, 278(22), 20196–20202.
- Fishback, J. A., Robson, M. J., Xu, Y.-T. y Matsumoto, R. R. (2010). Sigma receptors: potential targets for a new class of antidepressant drug. *Pharmacol. Ther.*, 127(3), 271–282.
- Flaisher-Grinberg, S. y Einat, H. (2010). Strain-specific battery of tests for domains of mania: effects of valproate, lithium and imipramine. *Front. Psychiatry*, 1, 10.
- Flaisher-Grinberg, S., Overgaard, S. y Einat, H. (2009). Attenuation of high sweet solution preference by mood stabilizers: a possible mouse model for the increased reward-seeking domain of mania. *J. Neurosci Methods*, 177(1), 44–50.
- Fond, G., Loundou, A., Rabu, C., Macgregor, A., Lançon, C., Brittner, M. y col. (2014). Ketamine administration in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Psychopharmacology*, 231(18), 3663–3676.

- Fountoulakis, K. N. (2012). The possible involvement of NMDA glutamate receptor in the etiopathogenesis of bipolar disorder. *Curr. Pharm. Des.*, 18(12), 1605–1608.
- France, G., Fernández-Fernández, D., Burnell, E. S., Irvine, M. W., Monaghan, D. T., Jane, D. E. y col. (2017). Multiple roles of GluN2B-containing NMDA receptors in synaptic plasticity in juvenile hippocampus. *Neuropharmacology*, 112(Pt A), 76–83.
- Friedman, E., Yan-Wang, H., Levinson, D., Connell, T. A. y Singh, H. (1993). Altered platelet protein kinase C activity in bipolar affective disorder, manic episode. *Biol. Psychiatry.*, 33(7), 520–525.
- Fujiwara, Y. y Minor, D. L. (2008). X-ray crystal structure of a TRPM assembly domain reveals an antiparallel four-stranded coiled-coil. *J. Mol. Biol.*, 383(4), 854–870.
- Fukuda, K., Kato, S., Mori, K., Nishi, M. y Takeshima, H. (1993). Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor delta- and mu-subtypes. *FEBS Lett.*, 327(3), 311–314.
- Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R. y Gouaux, E. (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, 438(7065), 185–192.
- Garzón, J., Castro, M. y Sánchez-Blázquez, P. (1998). Influence of Gz and Gi2 transducer proteins in the affinity of opioid agonists to mu receptors. *Eur. J. Neurosci.*, 10(8), 2557–2564.
- Garzón, J., de la Torre-Madrid, E., Rodríguez-Muñoz, M., Vicente-Sánchez, A. y Sánchez-Blázquez, P. (2009). Gz mediates the long-lasting desensitization of brain CB1 receptors and is essential for cross-tolerance with morphine. *Mol. Pain*, 5, 11.
- Garzón, J., Herrero-Labrador, R., Rodríguez-Muñoz, M., Shah, R., Vicente-Sánchez, A., Wagner, C. R. y Sánchez-Blázquez, P. (2015). HINT1 protein: a new therapeutic target to enhance opioid antinociception and block mechanical allodynia. *Neuropharmacology*, 89, 412–423.
- Garzón, J., Martínez-Peña, Y. y Sánchez-Blázquez, P. (1994). Dissimilar efficacy of opioids to produce mu-mediated analgesia: role of Gx/z and Gi2 transducer proteins. *Life Sci.*, 55(11), PL205–PL212.
- Garzón, J., Rodríguez-Muñoz, M. y Sánchez-Blázquez, P. (2005d). Morphine alters the selective association between mu-opioid receptors and specific RGS proteins in mouse periaqueductal gray matter. *Neuropharmacology*, 48(6), 853–868.
- Garzón, J., Rodríguez-Muñoz, M. y Sánchez-Blázquez, P. (2008). Do pharmacological approaches that prevent opioid tolerance target different elements in the same regulatory machinery? *Curr. Drug Abuse Rev.*, 1(2), 222–238.
- Garzón, J., Rodríguez-Muñoz, M. y Sánchez-Blázquez, P. (2012). Direct association of Mu-opioid and NMDA glutamate receptors supports their cross-regulation: molecular implications for opioid tolerance. *Curr. Drug Abuse Rev.*, 5(3), 199–226.

- Garzón, J., Rodríguez-Muñoz, M., de la Torre-Madrid, E. y Sánchez-Blázquez, P. (2005a). Effector antagonism by the regulators of G protein signaling (RGS) proteins causes desensitization of mu-opioid receptors in the CNS. *Psychopharmacology*, *180*(1), 1–11.
- Garzón, J., Rodríguez-Muñoz, M., López-Fando, A. y Sánchez-Blázquez, P. (2005b). Activation of mu-opioid receptors transfers control of Galpha subunits to the regulator of G-protein signaling RGS9-2: role in receptor desensitization. *J. Biol. Chem.*, *280*(10), 8951–8960.
- Garzón, J., Rodríguez-Muñoz, M., López-Fando, A. y Sánchez-Blázquez, P. (2005c). The RGSZ2 protein exists in a complex with mu-opioid receptors and regulates the desensitizing capacity of Gz proteins. *Neuropsychopharmacology*, *30*(9), 1632–1648.
- Garzón, J., Rodríguez-Muñoz, M., Vicente-Sánchez, A., Bailón, C., Martínez-Murillo, R. y Sánchez-Blázquez, P. (2011). RGSZ2 binds to the neural nitric oxide synthase PDZ domain to regulate mu-opioid receptor-mediated potentiation of the N-methyl-D-aspartate receptor-calmodulin-dependent protein kinase II pathway. *Antioxid. Redox. Signal.*, *15*(4), 873–887.
- Garzón-Niño, J., Rodríguez-Muñoz, M., Cortés-Montero, E. y Sánchez-Blázquez, P. (2017). Increased PKC activity and altered GSK3 β /NMDAR function drive behavior cycling in HINT1-deficient mice: bipolarity or opposing forces. *Sci. Rep.*, *7*, 43468.
- Gauchan, P., Andoh, T., Kato, A. y Kuraishi, Y. (2009). Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neurosc. Lett.*, *458*(2), 93–95.
- Gavva, N. R., Bannon, A. W., Surapaneni, S., Hovland, D. N., Lehto, S. G., Gore, A. y col. (2007). The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J. Neurosci.*, *27*(13), 3366–3374.
- Gees, M., Colsoul, B. y Nilius, B. (2010). The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, *2*(10), a003962.
- Genovese, G., Ghosh, P., Li, H., Rettino, A., Sioletic, S., Cittadini, A. y Sgambato, A. (2012). The tumor suppressor HINT1 regulates MITF and β -catenin transcriptional activity in melanoma cells. *Cell cycle*, *11*(11), 2206–2215.
- Gerber, G. y Randić, M. (1989). Excitatory amino acid-mediated components of synaptically evoked input from dorsal roots to deep dorsal horn neurons in the rat spinal cord slice. *Neurosci. Lett.*, *106*(1-2), 211–219.
- Gerber, Y. N., Privat, A. y Perrin, F. E. (2013). Gacyclidine improves the survival and reduces motor deficits in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.*, *7*, 280.
- Ghelardini, C., Galeotti, N., Vivoli, E., Norcini, M., Zhu, W., Stefano, G. B. y col. (2008). Molecular interaction in the mouse PAG between NMDA and opioid receptors in morphine-induced acute thermal nociception. *J. Neurochem.*, *105*(1), 91–100.

- Gillies, J. y Hochstrasser, M. (2012). A new class of SUMO proteases. *EMBO Rep.*, 13(4), 284–285.
- Gilmour, J., Liang, N. y Lowenstein, J. M. (1997). Isolation, cloning and characterization of a low-molecular-mass purine nucleoside- and nucleotide-binding protein. *Biochem. J.*, 326 (Pt 2), 471–477.
- Gintzler, A. R. y Pasternak, G. W. (1983). Multiple mu receptors: evidence for mu2 sites in the guinea pig ileum. *Neurosci. Lett.*, 39(1), 51–56.
- Giza, C. C., Maria, N. S. y Hovda, D. A. (2006). N-methyl-D-aspartate receptor subunit changes after traumatic injury to the developing brain. *J. Neurotrauma*, 23(6), 950–961.
- González-Cano, R., Montilla-García, Á., Ruiz-Cantero, M. C., Bravo-Caparrós, I., Tejada, M. Á., Nieto, F. R. y Cobos, E. J. (2020). The search for translational pain outcomes to refine analgesic development: Where did we come from and where are we going? *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 113, 238–261.
- Gouin, O., L'Herondelle, K., Lebonvallet, N., Le Gall-Ianotto, C., Sakka, M., Buhé, V. y col. (2017). TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein & cell*, 8(9), 644–661.
- Grabarek, Z. (2011). Insights into modulation of calcium signaling by magnesium in calmodulin, troponin C and related EF-hand proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1813(5), 913–921.
- Gracy, K. N., Svingos, A. L. y Pickel, V. M. (1997). Dual Ultrastructural Localization of μ -opioid Receptors and NMDA-Type Glutamate Receptors in the Shell of the Rat Nucleus Accumbens. *J. Neurosci*, 17, 4839–4848.
- Greengard, P. (2001). The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science*, 294(5544), 1024–1030.
- Greer, P. L. y Greenberg, M. E. (2008). From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron*, 59(6), 846–860.
- Gregianin, E., Pallafacchina, G., Zanin, S., Crippa, V., Rusmini, P., Poletti, A. y col. (2016). Loss-of-function mutations in the SIGMAR1 gene cause distal hereditary motor neuropathy by impairing ER-mitochondria tethering and Ca²⁺ signalling. *Hum. Mol. Genet.*, 25(17), 3741–3753.
- Grishin, A. A., Benquet, P. y Gerber, U. (2005). Muscarinic receptor stimulation reduces NMDA responses in CA3 hippocampal pyramidal cells via Ca²⁺-dependent activation of tyrosine phosphatase. *Neuropharmacology*, 49(3), 328–337.
- Gu, M., Fabrega, C., Liu, S.-W., Liu, H., Kiledjian, M. y Lima, C. D. (2004). Insights into the structure, mechanism, and regulation of scavenger mRNA decapping activity. *Mol. Cell*, 14(1), 67–80.

- Gu, Z., Kaul, M., Yan, B., Kridel, S. J., Cui, J., Strongin, A. y col. (2002). S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science*, 1186–1190.
- Gu, Z., Liu, W., Wei, J. y Yan, Z. (2012). Regulation of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptors by metabotropic glutamate receptor 7. *J. Biol. Chem.*, 287(13), 10265–10275.
- Guang, W., Wang, H., Su, T., Weinstein, I. B. y Wang, J. B. (2004). Role of mPKCI, a novel mu-opioid receptor interactive protein, in receptor desensitization, phosphorylation, and morphine-induced analgesia. *Mol. Pharmacol.*, 66(5), 1285–1292.
- Gundlach, A. L., Largent, B. L. y Snyder, S. H. (1986). Autoradiographic localization of sigma receptor binding sites in guinea pig and rat central nervous system with (+)3H-3-(3-hydroxyphenyl)-N-(1-propyl)piperidine. *J. Neurosci.*, 6(6), 1757–1770.
- Guo, W., Wei, F., Zou, S., Robbins, M. T., Sugiyo, S., Ikeda, T. y col. (2004). Group I metabotropic glutamate receptor NMDA receptor coupling and signaling cascade mediate spinal dorsal horn NMDA receptor 2B tyrosine phosphorylation associated with inflammatory hyperalgesia. *J. Neurosci.*, 24(41), 9161–9173.
- Hahn, C. G. y Friedman, E. (1999). Abnormalities in protein kinase C signaling and the pathophysiology of bipolar disorder. *Bipolar Disord.*, 1(2), 81–86.
- Hall, B. J., Ripley, B. y Ghosh, A. (2007). NR2B signaling regulates the development of synaptic AMPA receptor current. *J. Neurosci.*, 27(49), 13446–13456.
- Hannah-Poquette, C., Anderson, G. W., Flaisher-Grinberg, S., Wang, J., Meinerding, T. M. y Einat, H. (2011). Modeling mania: Further validation for Black Swiss mice as model animals. *Behav. Brain. Res.*, 223(1), 222–226.
- Hanner, M., Moebius, F. F., Flandorfer, A., Knaus, H. G., Striessnig, J., Kempner, E. y Glossmann, H. (1996). Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93(15), 8072–8077.
- Harada, Y., Nishioka, K., Kitahata, L. M., Nakatani, K. y Collins, J. G. (1995). Contrasting actions of intrathecal U50,488H, morphine, or [D-Pen2, D-Pen5] enkephalin or intravenous U50,488H on the visceromotor response to colorectal distension in the rat. *Anesthesiology*, 83(2), 336–343.
- Hardingham, G. (2019). NMDA receptor C-terminal signaling in development, plasticity, and disease. *F1000Research*, 8.
- Harrington, A. M., Hughes, P. A., Martin, C. M., Yang, J., Castro, J., Isaacs, N. J. y col. (2011). A novel role for TRPM8 in visceral afferent function. *Pain*, 152(7), 1459–1468.
- Harrison, P. J. y Weinberger, D. R. (2005). Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol. Psychiatry*, 10(1), 40–68.
- Hasan, R. y Zhang, X. (2018). Ca²⁺ Regulation of TRP Ion Channels. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(4).

- Hasan, R., Leeson-Payne, A. T., Jaggar, J. H. y Zhang, X. (3 de 2017). Calmodulin is responsible for Ca²⁺-dependent regulation of TRPA1 Channels. *Sci. Rep.*, 7, 45098.
- Hatton, C. J. y Paoletti, P. (2005). Modulation of trimeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. *Neuron*, 46(2), 261–274.
- Hay, R. T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol. Cell*, 18(1), 1–12.
- Hayashi, T. (2015). Sigma-1 receptor: the novel intracellular target of neuropsychotropic drugs. *J. Pharmacol. Sci.*, 127(1), 2–5.
- Hayashi, T. y Su, T.-P. (2003). Sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 306(2), 718–725.
- Hayashi, T. y Su, T.-P. (2004). Sigma-1 receptor ligands: potential in the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS drugs*, 18(5), 269–284.
- Hayashi, T. y Su, T.-P. (2007). Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell*, 131(3), 596–610.
- Hayashi, T., Tsai, S.-Y., Mori, T., Fujimoto, M. y Su, T.-P. (2011). Targeting ligand-operated chaperone sigma-1 receptors in the treatment of neuropsychiatric disorders. *Expert Opin. Ther. Targets*, 15(5), 557–577.
- Hayes, M. P. y Roman, D. L. (2016). Regulator of G Protein Signaling 17 as a Negative Modulator of GPCR Signaling in Multiple Human Cancers. *AAPS J.*, 18(3), 550–559.
- Heinricher, M. M., Schouten, J. C. y Jobst, E. E. (2001). Activation of brainstem N-methyl-D-aspartate receptors is required for the analgesic actions of morphine given systemically. *Pain*, 92(1-2), 129–138.
- Helliwell, R. J., McLatchie, L. M., Clarke, M., Winter, J., Bevan, S. y McIntyre, P. (1998). Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neurosci. Lett.*, 250(3), 177–180.
- Henry, C., Sorbara, F., Lacoste, J., Gindre, C. y Leboyer, M. (2001). Antidepressant-induced mania in bipolar patients: identification of risk factors. *J. Clin. Psychiatry*, 62(4), 249–255.
- Hepler, J. R., Berman, D. M., Gilman, A. G. y Kozasa, T. (1997). RGS4 and GAIP are GTPase-activating proteins for Gq alpha and block activation of phospholipase C beta by gamma-thio-GTP-Gq alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94(2), 428–432.
- Hickey, C. M., Wilson, N. R., & Hochstrasser, M. (2012). Function and regulation of SUMO proteases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 13(12), 755–766.
- Hinman, A., Chuang, H.-H., Bautista, D. M. y Julius, D. (2006). TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(51), 19564–19568.

- Hjerling-Leffler, J., Alqatari, M., Ernfors, P. y Koltzenburg, M. (2007). Emergence of functional sensory subtypes as defined by transient receptor potential channel expression. *J. Neurosci.*, 27(10), 2435–2443.
- Hoffmann, T., Kistner, K., Miermeister, F., Winkelmann, R., Wittmann, J., Fischer, M. J. y col. (2013). TRPA1 and TRPV1 are differentially involved in heat nociception of mice. *Eur. J. Pain.*, 17(10), 1472–1482.
- Holzer, P. (2011). Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system. *Pharmacol. Ther.*, 131(1), 142–170.
- Honore, P., Wismer, C. T., Mikusa, J., Zhu, C. Z., Zhong, C., Gauvin, D. M. y col. (2005). A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 314(1), 410–421.
- Hor, H., Francescato, L., Bartesaghi, L., Ortega-Cubero, S., Kousi, M., Lorenzo-Betancor, O. y col. (2015). Missense mutations in TENM4, a regulator of axon guidance and central myelination, cause essential tremor. *Hum. Mol. Genet.*, 24(20), 5677–5686.
- Huang, H., Wei, X., Su, X., Qiao, F., Xu, Z., Gu, D., y col. (2011). Clinical significance of expression of Hint1 and potential epigenetic mechanism in gastric cancer. *Int. J. Oncol.*, 38(6), 1557–1564.
- Huang, J., Zhang, X. y McNaughton, P. A. (2006). Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr. Neuropharmacol.*, 4(3), 197–206.
- Huang, K., Arabshahi, A., Wei, Y. y Frey, P. A. (2004). The mechanism of action of the fragile histidine triad, Fhit: isolation of a covalent adenylyl enzyme and chemical rescue of H96G-Fhit. *Biochemistry*, 43(23), 7637–7642.
- Huang, Y., Fliegert, R., Guse, A. H., Lü, W. y Du, J. (2020). A structural overview of the ion channels of the TRPM family. *Cell calcium*, 85, 102111.
- Huber, O. y Weiske, J. (2008). Beta-catenin takes a HIT. *Cell cycle*, 7(10), 1326–1331.
- Huebner, K. y Croce, C. M. (2003). Cancer and the FRA3B/FHIT fragile locus: it's a HIT. *Br. J. Cancer*, 88(10), 1501–1506.
- Hughes, K., Nikolakaki, E., Plyte, S. E., Totty, N. F. y Woodgett, J. R. (1993). Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.*, 12(2), 803–808.
- Huidobro, F., Huidobro-Toro, J. P. y Leong Way, E. (1976). Studies on tolerance development to single doses of morphine in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 198(2), 318–329.
- Immke, D. C. y Gavva, N. R. (2006). The TRPV1 receptor and nociception. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 17(5), 582–591.

- Inoue, M., Mishina, M. y Ueda, H. (2003). Locus-specific rescue of GluRepsilon1 NMDA receptors in mutant mice identifies the brain regions important for morphine tolerance and dependence. *J. Neurosci.*, 23(16), 6529–6536.
- Jackson, K. J., Chen, Q., Chen, J., Aggen, S. H., Kendler, K. S. y Chen, X. (2011). Association of the histidine-triad nucleotide-binding protein-1 (HINT1) gene variants with nicotine dependence. *Pharmacogenomics J.*, 11(4), 251–257.
- Jackson, K. J., Wang, J. B., Barbier, E., Chen, X. y Damaj, M. I. (2012). Acute behavioral effects of nicotine in male and female HINT1 knockout mice. *Genes Brain Behav.*, 11(8), 993–1000.
- Jackson, K. J., Wang, J. B., Barbier, E., Damaj, M. I. y Chen, X. (2013). The histidine triad nucleotide binding 1 protein is involved in nicotine reward and physical nicotine withdrawal in mice. *Neurosci. Lett.*, 550, 129–133.
- James, P., Vorherr, T., & Carafoli, E. (1995). Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted? *Trends Biochem. Sci.*, 20(1), 38–42.
- Jancsó-Gábor, A., Szolcsányi, J. y Jancsó, N. (1970). Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat-sensitive structures by capsaicin in rats. *J. Physiol.*, 208(2), 449–459.
- Jentsch, J. D., Taylor, J. R. y Roth, R. H. (1998). Subchronic phencyclidine administration increases mesolimbic dopaminergic system responsivity and augments stress- and psychostimulant-induced hyperlocomotion. *Neuropsychopharmacology*, 19(2), 105–113.
- Ji, R.-R., Samad, T. A., Jin, S.-X., Schmoll, R. y Woolf, C. J. (2002). p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron*, 36(1), 57–68.
- Jiang, Q., Takemori, A. E., Sultana, M., Portoghese, P. S., Bowen, W. D., Mosberg, H. I. y Porreca, F. (1991). Differential antagonism of opioid delta antinociception by [D-Ala²,Leu⁵,Cys⁶]enkephalin and naltrindole 5'-isothiocyanate: evidence for delta receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 257(3), 1069–1075.
- Jones, M. L. y Leonard, J. P. (2005). PKC site mutations reveal differential modulation by insulin of NMDA receptors containing NR2A or NR2B subunits. *J. Neurochem.*, 92(6), 1431–1438.
- Jope, R. S. y Roh, M.-S. (2006). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Curr. Drug Targets*, 7(11), 1421–1434.
- Jordan, J. D., Carey, K. D., Stork, P. J. y Iyengar, R. (1999). Modulation of rap activity by direct interaction of Galpha(o) with Rap1 GTPase-activating protein. *J. Biol. Chem.*, 274(31), 21507–21510.
- Jordt, S.-E., Bautista, D. M., Chuang, H.-H., McKemy, D. D., Zygmunt, P. M., Högestätt, E. D. y col. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*, 427(6971), 260–265.

- Juetten, J. y Einat, H. (2012). Behavioral differences in black Swiss mice from separate colonies: implications for modeling domains of mania. *Behav. Pharmacol.*, 23(2), 211–214.
- Julius, D. (2013). TRP channels and pain. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, 29, 355–384.
- Jung, J., Shin, J. S., Lee, S.-Y., Hwang, S. W., Koo, J., Cho, H. y Oh, U. (2004). Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J. Biol. Chem.*, 279(8), 7048–7054.
- Kaidanovich-Beilin, O., Milman, A., Weizman, A., Pick, C. G. y Eldar-Finkelman, H. (2004). Rapid antidepressive-like activity of specific glycogen synthase kinase-3 inhibitor and its effect on beta-catenin in mouse hippocampus. *Biol. Psychiatry*, 55(8), 781–784.
- Kalb, R. G. y Fox, A. J. (1997). Synchronized overproduction of AMPA, kainate, and NMDA glutamate receptors during human spinal cord development. *J. Comp. Neurol.*, 384(2), 200–210.
- Kalinichev, M. y Dawson, L. A. (2011). Evidence for antimanic efficacy of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) inhibitors in a strain-specific model of acute mania. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 14(8), 1051–1067.
- Kaneko, Y. y Szallasi, A. (2014). Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br. J. Pharmacol.*, 171(10), 2474–2507.
- Kantrowitz, J. T. y Javitt, D. C. (2010). N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor dysfunction or dysregulation: the final common pathway on the road to schizophrenia? *Brain Res. Bul.*, 83(3-4), 108–121.
- Karashima, Y., Damann, N., Prenen, J., Talavera, K., Segal, A., Voets, T. y Nilius, B. (2007). Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J. Neurosci.*, 27(37), 9874–9884.
- Kark, T., Bagi, Z., Lizanecz, E., Pásztor, E. T., Erdei, N., Czikora, A. y col. (2008). Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. *Mol. Pharmacol.*, 73(5), 1405–1412.
- Karolewicz, B., Szebeni, K., Gilmore, T., Maciag, D., Stockmeier, C. A. y Ordway, G. A. (2009). Elevated levels of NR2A and PSD-95 in the lateral amygdala in depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 12(2), 143–153.
- Katsura, H., Obata, K., Mizushima, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y. y col. (2006). Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. *Exp. Neurol.*, 200(1), 112–123.
- Kawashiri, T., Egashira, N., Kurobe, K., Tsutsumi, K., Yamashita, Y., Ushio, S. y col. (2012). L type Ca²⁺ channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats. *Mol. Pain*, 8, 7.
- Kemp, J. A. y McKernan, R. M. (2002). NMDA receptor pathways as drug targets. *Nature Neurosci.*, 5 Suppl, 1039–1042.

- Kenzelmann, D., Chiquet-Ehrismann, R. y Tucker, R. P. (2007). Teneurins, a transmembrane protein family involved in cell communication during neuronal development. *Cell. Mol. Life Sci.*, 64(12), 1452–1456.
- Kerstein, P. C., del Camino, D., Moran, M. M. y Stucky, C. L. (2009). Pharmacological blockade of TRPA1 inhibits mechanical firing in nociceptors. *Mol. Pain*, 5, 19.
- Kheradpezhoh, E., Choy, J. M., Daria, V. R. y Arabzadeh, E. (2017). TRPA1 expression and its functional activation in rodent cortex. *Open Biol.*, 7(4).
- Kieffer, B. L. y Gavériaux-Ruff, C. (2002). Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog. Neurobiol.*, 66(5), 285–306.
- Kijas, A. W., Harris, J. L., Harris, J. M. y Lavin, M. F. (2006). Aprataxin forms a discrete branch in the HIT (histidine triad) superfamily of proteins with both DNA/RNA binding and nucleotide hydrolase activities. *J. Biol. Chem.*, 281(20), 13939–13948.
- Kijpornyongpan, T., Sereemasun, A. y Chanchao, C. (2014). Dose-dependent cytotoxic effects of menthol on human malignant melanoma A-375 cells: correlation with TRPM8 transcript expression. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 15(4), 1551–1556.
- Kim, F. J., Kovalyshyn, I., Burgman, M., Neilan, C., Chien, C.-C. y Pasternak, G. W. (2010). Sigma 1 receptor modulation of G-protein-coupled receptor signaling: potentiation of opioid transduction independent from receptor binding. *Mol. Pharmacol.*, 77(4), 695–703.
- Kim, Y. H., Park, C.-K., Back, S. K., Lee, C. J., Hwang, S. J., Bae, Y. C. y col. (2009). Membrane-delimited coupling of TRPV1 and mGluR5 on presynaptic terminals of nociceptive neurons. *J. Neurosci.*, 29(32), 10000–10009.
- Kim, Y. S., Son, J. Y., Kim, T. H., Paik, S. K., Dai, Y., Noguchi, K. y col. (2010). Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in the rat trigeminal sensory afferents and spinal dorsal horn. *J. Comp. Neurol.*, 518(5), 687–698.
- Kinkelin, I., Bröcker, E. B., Koltzenburg, M. y Carlton, S. M. (2000). Localization of ionotropic glutamate receptors in peripheral axons of human skin. *Neurosci. Lett.*, 283(2), 149–152.
- Kitagawa, Y., Tamai, I., Hamada, Y., Usui, K., Wada, M., Sakata, M. y Matsushita, M. (2013a). Orally administered selective TRPV1 antagonist, JTS-653, attenuates chronic pain refractory to non-steroidal anti-inflammatory drugs in rats and mice including post-herpetic pain. *J. Pharmacol. Sci.*, 122(2), 128–137.
- Kitagawa, Y., Wada, M., Kanehisa, T., Miyai, A., Usui, K., Maekawa, M. y col. (2013b). JTS-653 blocks afferent nerve firing and attenuates bladder overactivity without affecting normal voiding function. *J. Urol.*, 189(3), 1137–1146.
- Kitaichi, K., Chabot, J. G., Moebius, F. F., Flandorfer, A., Glossmann, H. y Quirion, R. (2000). Expression of the purported sigma(1) receptor in the mammalian brain and its possible relevance in deficits induced by antagonism of the NMDA receptor complex as revealed using an antisense strategy. *J. Chem. Neuroanat.*, 20(3-4), 375–387.

- Kiyatkin, M. E., Feng, B., Schwartz, E. S. y Gebhart, G. F. (2013). Combined genetic and pharmacological inhibition of TRPV1 and P2X3 attenuates colorectal hypersensitivity and afferent sensitization. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 305(9), G638–G648.
- Klepstad, P., Fladvad, T., Skorpen, F., Bjordal, K., Caraceni, A., Dale, O. y col. (2011). Influence from genetic variability on opioid use for cancer pain: a European genetic association study of 2294 cancer pain patients. *Pain*, 152(5), 1139–1145.
- Knapp, R. J., Malatynska, E., Fang, L., Li, X., Babin, E., Nguyen, M. y col. (1994). Identification of a human delta opioid receptor: cloning and expression. *Life Sci.*, 54(25), PL463–PL469.
- Knowlton, W. M., Daniels, R. L., Palkar, R., McCoy, D. D. y McKemy, D. D. (2011). Pharmacological blockade of TRPM8 ion channels alters cold and cold pain responses in mice. *PloS one*, 6(9), e25894.
- Kobayashi, K., Fukuoka, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tokunaga, A. y Noguchi, K. (2005). Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J. Comp. Neurol.*, 493(4), 596–606.
- Koch, T., Schulz, S., Pfeiffer, M., Klutzny, M., Schröder, H., Kahl, E. y Höllt, V. (2001). C-terminal splice variants of the mouse mu-opioid receptor differ in morphine-induced internalization and receptor resensitization. *J. Biol. Chem.*, 276(33), 31408–31414.
- Koch, T., Widera, A., Bartsch, K., Schulz, S., Brandenburg, L.-O., Wundrack, N. y col. (2005). Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Mol. Pharmacol.*, 67(1), 280–287.
- Kojima, R., Nozawa, K., Doihara, H., Keto, Y., Kaku, H., Yokoyama, T. y Itou, H. (2014). Effects of novel TRPA1 receptor agonist ASP7663 in models of drug-induced constipation and visceral pain. *Eur. J. Pharmacol.*, 723, 288–293.
- Koltzenburg, M., Lundberg, L. E. y Torebjörk, E. H. (1992). Dynamic and static components of mechanical hyperalgesia in human hairy skin. *Pain*, 51(2), 207–219.
- Koplas, P. A., Rosenberg, R. L. y Oxford, G. S. (1997). The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.*, 17(10), 3525–3537.
- Kornetsky, C. y Bain, G. (1968). Morphine: single-dose tolerance. *Science*, 162(3857), 1011–1012.
- Korsisaari, N. y Mäkelä, T. P. (2000). Interactions of Cdk7 and Kin28 with Hint/PKCI-1 and Hnt1 histidine triad proteins. *J. Biol. Chem.*, 275(45), 34837–34840.
- Kotecha, S. A. y MacDonald, J. F. (2003). Signaling molecules and receptor transduction cascades that regulate NMDA receptor-mediated synaptic transmission. *Int. Rev. Neurobiol.*, 54, 51–106.
- Kourrich, S., Su, T.-P., Fujimoto, M. y Bonci, A. (2012). The sigma-1 receptor: roles in neuronal plasticity and disease. *Trends Neurosci.*, 35(12), 762–771.

- Kovoor, A., Henry, D. J. y Chavkin, C. (1995). Agonist-induced desensitization of the mu opioid receptor-coupled potassium channel (GIRK1). *J. Biol. Chem.*, 270(2), 589–595.
- Kow, L.-M., Commons, K. G., Ogawa, S. y Pfaff, D. W. (2002). Potentiation of the excitatory action of NMDA in ventrolateral periaqueductal gray by the mu-opioid receptor agonist, DAMGO. *Brain Res.*, 935(1-2), 87–102.
- Koyama, S. y Akaike, N. (2008). Activation of mu-opioid receptor selectively potentiates NMDA-induced outward currents in rat locus coeruleus neurons. *Neurosci. Res.*, 60(1), 22–28.
- Kraft, R. y Harteneck, C. (2005). The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch.*, 451(1), 204–211.
- Krakowiak, A., Kaczmarek, R., Baraniak, J., Wieczorek, M. y Stec, W. J. (2007). Stereochemistry of rHint1 hydrolase assisted cleavage of P-N bond in nucleoside 5'-O-phosphoramidothioates. *Chem. Commun. (Camb.)*, (21), 2163–2165.
- Kremeyer, B., Lopera, F., Cox, J. J., Momin, A., Rugiero, F., Marsh, S. y col. (2010). A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron*, 66(5), 671–680.
- Kristensen, J. D., Karlsten, R., Gordh, T. y Berge, O.-G. (1994). The NMDA antagonist 3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid (CPP) has antinociceptive effect after intrathecal injection in the rat. *Pain*, 56(1), 59–67.
- Kristiansen, L. V., Huerta, I., Beneyto, M. y Meador-Woodruff, J. H. (2007). NMDA receptors and schizophrenia. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 7(1), 48–55.
- Kumar, V., Chichili, V. P., Tang, X. y Sivaraman, J. (2013). A novel trans conformation of ligand-free calmodulin. *PLoS one*, 8(1), e54834.
- Kunert-Keil, C., Bisping, F., Krüger, J. y Brinkmeier, H. (2006). Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC genomics*, 7, 159.
- Kwak, J., Wang, M. H., Hwang, S. W., Kim, T. Y., Lee, S. Y. y Oh, U. (2000). Intracellular ATP increases capsaicin-activated channel activity by interacting with nucleotide-binding domains. *J. Neurosci.*, 20(22), 8298–8304.
- Kwan, K. Y., Allchorne, A. J., Vollrath, M. A., Christensen, A. P., Zhang, D.-S., Woolf, C. J. y Corey, D. P. (2006). TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron*, 50(2), 277–289.
- Kwan, K. Y., Glazer, J. M., Corey, D. P., Rice, F. L. y Stucky, C. L. (2009). TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J. Neurosci.*, 29(15), 4808–4819.
- Laloo, U. G., Fox, A. J., Belvisi, M. G., Chung, K. F. y Barnes, P. J. (1995). Capsazepine inhibits cough induced by capsaicin and citric acid but not by hypertonic saline in guinea pigs. *J. Appl. Physiol.*, 79(4), 1082–1087.

- Lašuthová, P., Brožková, D. Š., Krůtová, M., Neupauerová, J., Haberlová, J., Mazanec, R. y col. (2015). Mutations in HINT1 are one of the most frequent causes of hereditary neuropathy among Czech patients and neuromyotonia is rather an underdiagnosed symptom. *Neurogenetics*, 16(1), 43–54.
- Lau, S.-Y., Procko, E. y Gaudet, R. (2012). Distinct properties of Ca²⁺-calmodulin binding to N- and C-terminal regulatory regions of the TRPV1 channel. *J. Gen. Physiology*, 140(5), 541–555.
- Laube, B., Kuhse, J. y Betz, H. (1998). Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J. Neurosci.*, 18(8), 2954–2961.
- Laursen, W. J., Anderson, E. O., Hoffstaetter, L. J., Bagriantsev, S. N. y Gracheva, E. O. (2015). Species-specific temperature sensitivity of TRPA1. *Temperature (Austin)*, 2(2), 214–226.
- Law, P. Y., Wong, Y. H. y Loh, H. H. (2000). Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 40, 389–430.
- Lee, J. y Ro, J. Y. (2007). Differential regulation of glutamate receptors in trigeminal ganglia following masseter inflammation. *Neurosci. Lett.*, 421(2), 91–95.
- Lehto, S. G., Tamir, R., Deng, H., Klionsky, L., Kuang, R., Le, A. y col. (2008). Antihyperalgesic effects of (R,E)-N-(2-hydroxy-2,3-dihydro-1H-inden-4-yl)-3-(2-(piperidin-1-yl)-4-(trifluoromethyl)phenyl)-acrylamide (AMG8562), a novel transient receptor potential vanilloid type 1 modulator that does not cause hyperthermia in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 326(1), 218–229.
- Li, C., Tan, Y.-X., Zhou, H., Ding, S.-J., Li, S.-J., Ma, D.-J. y col. (2005). Proteomic analysis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma: Identification of potential tumor markers. *Proteomics*, 5(4), 1125–1139.
- Li, H., Balajee, A. S., Su, T., Cen, B., Hei, T. K. y Weinstein, I. B. (2008). The HINT1 tumor suppressor regulates both gamma-H2AX and ATM in response to DNA damage. *J. Cell. Biol.*, 183(2), 253–265.
- Li, H., Zhang, Y., Su, T., Santella, R. M. y Weinstein, I. B. (2006). Hint1 is a haplo-insufficient tumor suppressor in mice. *Oncogene*, 25(5), 713–721.
- Li, J. G., Luo, L. Y., Krupnick, J. G., Benovic, J. L. y Liu-Chen, L. Y. (1999). U50,488H-induced internalization of the human kappa opioid receptor involves a beta-arrestin- and dynamin-dependent mechanism. Kappa receptor internalization is not required for mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.*, 274(17), 12087–12094.
- Li, W., Cai, S., Wang, L., Yang, C., Zhou, B. y Wang, H. (2017). HINT2 downregulation promotes colorectal carcinoma migration and metastasis. *Oncotarget*, 8(8), 13521–13531.
- Liao, M., Cao, E., Julius, D. y Cheng, Y. (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, 504(7478), 107–112.
- Lima, C. D., Klein, M. G. y Hendrickson, W. A. (1997). Structure-based analysis of catalysis and substrate definition in the HIT protein family. *Science*, 278(5336), 286–290.

- Lima, C. D., Klein, M. G., Weinstein, I. B. y Hendrickson, W. A. (1996). Three-dimensional structure of human protein kinase C interacting protein 1, a member of the HIT family of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93(11), 5357–5362.
- Lipton, S. A. (2006). Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5(2), 160–170.
- Lishko, P. V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C. B. y Gaudet, R. (2007). The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron*, 54(6), 905–918.
- Liu, B., Ma, W., Ryu, S. y Qin, F. (2004). Inhibitory modulation of distal C-terminal on protein kinase C-dependent phospho-regulation of rat TRPV1 receptors. *J. Physiol.*, 560(Pt 3), 627–638.
- Liu, B., Yao, J., Wang, Y., Li, H. y Qin, F. (2009). Proton inhibition of unitary currents of vanilloid receptors. *J. Gen. Physiol.*, 134(3), 243–258.
- Liu, B., Zhang, C. y Qin, F. (2005). Functional recovery from desensitization of vanilloid receptor TRPV1 requires resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurosci.*, 25(19), 4835–4843.
- Liu, F., Ma, J., Liu, P., Chu, Z., Lei, G., Jia, X.-d. y col. (2016). Hint1 gene deficiency enhances the supraspinal nociceptive sensitivity in mice. *Brain Behav.*, 6(8), e00496.
- Liu, H., Rodgers, N. D., Jiao, X. y Kiledjian, M. (2002). The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J.*, 21(17), 4699–4708.
- Liu, P., Liu, Z., Wang, J., Ma, X. y Dang, Y. (2017). HINT1 in Neuropsychiatric Diseases: A Potential Neuroplastic Mediator. *Neural Plast.*, 2017, 5181925.
- Liu, Q., Bhat, M., Bowen, W. D. y Cheng, J. (2009). Signaling pathways from cannabinoid receptor-1 activation to inhibition of N-methyl-D-aspartic acid mediated calcium influx and neurotoxicity in dorsal root ganglion neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 331(3), 1062–1070.
- Liu, Q., Puche, A. C. y Wang, J. B. (2008). Distribution and expression of protein kinase C interactive protein (PKCI/HINT1) in mouse central nervous system (CNS). *Neurochem. Res.*, 33(7), 1263–1276.
- Liu, W., Yuen, E. Y., Allen, P. B., Feng, J., Greengard, P. y Yan, Z. (2006). Adrenergic modulation of NMDA receptors in prefrontal cortex is differentially regulated by RGS proteins and spinophilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103(48), 18338–18343.
- Liu, X. J. y Salter, M. W. (2010). Glutamate receptor phosphorylation and trafficking in pain plasticity in spinal cord dorsal horn. *Eur. J. Neurosci.*, 32(2), 278–289.
- Liu, X.-B., Murray, K. D. y Jones, E. G. (2004). Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *J. Neurosci.*, 24(40), 8885–8895.

- Liu, Z., Wu, H., Wei, Z., Wang, X., Shen, P., Wang, S. y col. (2016). TRPM8: a potential target for cancer treatment. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 142(9), 1871–1881.
- Logan, R. W. y McClung, C. A. (2016). Animal models of bipolar mania: The past, present and future. *Neuroscience*, 321, 163–188.
- Lord, J. A., Waterfield, A. A., Hughes, J. y Kosterlitz, H. W. (1977). Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature*, 267(5611), 495–499.
- Low, C.-M. y Wee, K. S.-L. (2010). New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-aspartate receptor: localization, structure, and function. *Mol. Pharmacol.*, 78(1), 1–11
- Lozano-Ondoua, A. N., Symons-Liguori, A. M. y Vanderah, T. W. (2013). Cancer-induced bone pain: Mechanisms and models. *Neurosci. Lett.*, 557 Pt A, 52–59.
- Lu, H., Le, W. D., Xie, Y.-Y. y Wang, X.-P. (2016). Current Therapy of Drugs in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr. Neuropharmacol.*, 14(4), 314–321.
- Lutzu, S. y Castillo, P. E. (2020). Modulation of NMDA Receptors by G-protein-coupled receptors: Role in Synaptic Transmission, Plasticity and Beyond. *Neuroscience*.
- Ma, Y. C., Huang, J., Ali, S., Lowry, W. y Huang, X. Y. (2000). Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell*, 102(5), 635–646.
- Macpherson, L. J., Dubin, A. E., Evans, M. J., Marr, F., Schultz, P. G., Cravatt, B. F. y Patapoutian, A. (2007). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature*, 445(7127), 541–545.
- Madry, C., Mesic, I., Bartholomäus, I., Nicke, A., Betz, H. y Laube, B. (2007). Principal role of NR3 subunits in NR1/NR3 excitatory glycine receptor function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354(1), 102–108.
- Maeng, S. y Zarate, C. A. (2007). The role of glutamate in mood disorders: results from the ketamine in major depression study and the presumed cellular mechanism underlying its antidepressant effects. *Curr. Psychiatry Rep.*, 9(6), 467–474.
- Maher, S. A., Dubuis, E. D. y Belvisi, M. G. (2011). G-protein coupled receptors regulating cough. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 11(3), 248–253.
- Maize, K. M., Wagner, C. R. y Finzel, B. C. (2013). Structural characterization of human histidine triad nucleotide-binding protein 2, a member of the histidine triad superfamily. *FEBS J.*, 280(14), 3389–3398.
- Makman, M. H., Bilfinger, T. V. y Stefano, G. B. (1995). Human granulocytes contain an opiate alkaloid-selective receptor mediating inhibition of cytokine-induced activation and chemotaxis. *J. Immunol.*, 154(3), 1323–1330.
- Malin, S. A., Molliver, D. C., Koerber, H. R., Cornuet, P., Frye, R., Albers, K. M. y Davis, B. M. (2006). Glial cell line-derived neurotrophic factor family members sensitize nociceptors in vitro and produce thermal hyperalgesia in vivo. *J. Neurosci.*, 26(33), 8588–8599.

- Mallet, C., Barrière, D. A., Ermund, A., Jönsson, B. A., Eschalier, A., Zygmunt, P. M. y Högestätt, E. D. (2010). TRPV1 in brain is involved in acetaminophen-induced antinociception. *PloS one*, 5(9).
- Mandadi, S., Tominaga, T., Numazaki, M., Murayama, N., Saito, N., Armati, P. J. y col. (2006). Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKCepsilon-mediated phosphorylation at S800. *Pain*, 123(1-2), 106–116.
- Mansour, A., Fox, C. A., Akil, H. y Watson, S. J. (1995). Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.*, 18(1), 22–29.
- Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, M. E., Akil, H. y Watson, S. J. (1988). Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci.*, 11(7), 308–314.
- Mansson, E., Bare, L. y Yang, D. (1994). Isolation of a human kappa opioid receptor cDNA from placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 202(3), 1431–1437.
- Maqboul, A. y Elsadek, B. (2017). A Novel Model of Cancer-Induced Peripheral Neuropathy and the Role of TRPA1 in Pain Transduction. *Pain Res. Manag.*, 2017, 3517207.
- Maret, W. (2006). Zinc coordination environments in proteins as redox sensors and signal transducers. *Antioxid. Redox Signal.*, 8(9-10), 1419–1441.
- Marinissen, M. J., & Gutkind, J. S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.*, 22(7), 368–376.
- Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A. y col. (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*, 302(5642), 84–88.
- Martin, A., Young, C., Leckman, J. F., Mukonoweshuro, C., Rosenheck, R. y Leslie, D. (2004). Age effects on antidepressant-induced manic conversion. *Arch Pediatr. Adolesc. Med.*, 158(8), 773–780.
- Martin, G., Nie, Z. y Siggins, G. R. (1997). Mu-opioid receptors modulate NMDA receptor-mediated responses in nucleus accumbens neurons. *J. Neurosci.*, 17(1), 11–22.
- Martin, J., Magnino, F., Schmidt, K., Piguet, A.-C., Lee, J.-S., Semela, D. y col. (2006). Hint2, a mitochondrial apoptotic sensitizer down-regulated in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 130(7), 2179–2188.
- Martin, J., Maurhofer, O., Bellance, N., Benard, G., Graber, F., Hahn, D. y col. (2013). Disruption of the histidine triad nucleotide-binding hint2 gene in mice affects glycemic control and mitochondrial function. *Hepatology*, 57(5), 2037–2048.
- Martin, J., St-Pierre, M. V. y Dufour, J.-F. (2011). Hit proteins, mitochondria and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1807(6), 626–632.

- Martin, W. R., Eades, C. G., Thompson, J. A., Huppler, R. E. y Gilbert, P. E. (1976). The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 197(3), 517–532.
- Martins-de-Souza, D., Guest, P. C., Harris, L. W., Vanattou-Saifoudine, N., Webster, M. J., Rahmoune, H. y Bahn, S. (2012). Identification of proteomic signatures associated with depression and psychotic depression in post-mortem brains from major depression patients. *Transl. Psychiatry*, 2, e87.
- Massotte, D., Brillet, K., Kieffer, B. y Milligan, G. (2002). Agonists activate Gi1 alpha or Gi2 alpha fused to the human mu opioid receptor differently. *J. Neurochem.*, 81(6), 1372–1382.
- Materazzi, S., Benemei, S., Fusi, C., Gualdani, R., De Siena, G., Vastani, N. y col. (2013). Parthenolide inhibits nociception and neurogenic vasodilatation in the trigeminovascular system by targeting the TRPA1 channel. *Pain*, 154(12), 2750–2758.
- Mathews, D. C., Henter, I. D. y Zarate, C. A. (2012). Targeting the glutamatergic system to treat major depressive disorder: rationale and progress to date. *Drugs*, 72(10), 1313–1333.
- Maurice, T. y Su, T.-P. (2009). The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol. Ther.*, 124(2), 195–206.
- Mavlyutov, T. A., Epstein, M. L., Andersen, K. A., Ziskind-Conhaim, L. y Ruoho, A. E. (2010). The sigma-1 receptor is enriched in postsynaptic sites of C-terminals in mouse motoneurons. An anatomical and behavioral study. *Neuroscience*, 167(2), 247–255.
- McCall, K. A., Huang, C. y Fierke, C. A. (2000). Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J. Nutr.*, 130(5S Suppl), 1437S–1446S.
- McCullumsmith, R. E., Kristiansen, L. V., Beneyto, M., Scarr, E., Dean, B. y Meador-Woodruff, J. H. (2007). Decreased NR1, NR2A, and SAP102 transcript expression in the hippocampus in bipolar disorder. *Brain Res.*, 1127(1), 108–118.
- McDonald, J. R. y Walsh, M. P. (1985). Ca²⁺-binding proteins from bovine brain including a potent inhibitor of protein kinase C. *Biochem. J.*, 232(2), 559–567.
- McDonald, J. R., Gröschel-Stewart, U. y Walsh, M. P. (1987). Properties and distribution of the protein inhibitor (Mr 17,000) of protein kinase C. *Biochem. J.*, 242(3), 695–705.
- McGirr, A., Berlim, M. T., Bond, D. J., Fleck, M. P., Yatham, L. N. y Lam, R. W. (3 de 2015). A systematic review and meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials of ketamine in the rapid treatment of major depressive episodes. *Psychol. Med.*, 45(4), 693–704.
- McIntire, W. E. (2009). Structural determinants involved in the formation and activation of G protein betagamma dimers. *Neuro-Signals*, 17(1), 82–99.
- McKemy, D. D., Neuhausser, W. M. y Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 416(6876), 52–58.

- McMichael, G., Bainbridge, M. N., Haan, E., Corbett, M., Gardner, A., Thompson, S. y col. (2015). Whole-exome sequencing points to considerable genetic heterogeneity of cerebral palsy. *Mol. Psychiatry*, 20(2), 176–182.
- McNamara, C. R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D. M., Siemens, J., Deranian, K. L., Zhao, M. y col. (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104(33), 13525–13530.
- McRoberts, J. A., Coutinho, S. V., Marvizón, J. C., Grady, E. F., Tognetto, M., Sengupta, J. N. y col. (2001). Role of peripheral N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in visceral nociception in rats. *Gastroenterology*, 120(7), 1737–1748.
- Meddows, E., Le Bourdelles, B., Grimwood, S., Wafford, K., Sandhu, S., Whiting, P. y McIlhinney, R. A. (2001). Identification of molecular determinants that are important in the assembly of N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. chem.*, 276(22), 18795–18803.
- Meents, J. E., Fischer, M. J. y McNaughton, P. A. (2017). Sensitization of TRPA1 by Protein Kinase A. *PloS one*, 12(1), e0170097.
- Mei, J. y Pasternak, G. W. (2002). Sigma1 receptor modulation of opioid analgesia in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 300(3), 1070–1074.
- Meng, J., Glick, J. L., Polakis, P. y Casey, P. J. (1999). Functional interaction between Galpha(z) and Rap1GAP suggests a novel form of cellular cross-talk. *J. Biol. Chem.*, 274(51), 36663–36669.
- Meng, L., Fu, J., Lv, H., Zhang, W., Wang, Z. y Yuan, Y. (2018). Novel mutations in HINT1 gene cause autosomal recessive axonal neuropathy with neuromyotonia in two cases of sensorimotor neuropathy and one case of motor neuropathy. *Neuromuscul. disord.*, 28(8), 646–651.
- Mickle, A. D., Shepherd, A. J. y Mohapatra, D. P. (2015). Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 131, 73–118.
- Mikolajczyk, J., Drag, M., Békés, M., Cao, J. T., Ronai, Z. y Salvesen, G. S. (2007). Small ubiquitin-related modifier (SUMO)-specific proteases: profiling the specificities and activities of human SENPs. *J. Biol. Chem.*, 282(36), 26217–26224.
- Milac, A. L., Bojarska, E. y Wypijewska del Nogal, A. (2014). Decapping Scavenger (DcpS) enzyme: advances in its structure, activity and roles in the cap-dependent mRNA metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, 1839(6), 452–462.
- Min, B. H., Augustin, L. B., Felsheim, R. F., Fuchs, J. A. y Loh, H. H. (1994). Genomic structure analysis of promoter sequence of a mouse mu opioid receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91(19), 9081–9085.
- Mitchell, J., Paul, P., Chen, H.-J., Morris, A., Payling, M., Falchi, M. y col. (2010). Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107(16), 7556–7561.

- Mizoguchi, H., Watanabe, C., Yonezawa, A., & Sakurada, S. (2009). New therapy for neuropathic pain. *International review of neurobiology*, 85, 249–260. doi:10.1016/S0074-7742(09)85019-8
- Mochizuki, N., Ohba, Y., Kiyokawa, E., Kurata, T., Murakami, T., Ozaki, T. y col. (1999). Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G α (i). *Nature*, 400(6747), 891–894.
- Moghaddam, B. y Javitt, D. (2012). From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology*, 37(1), 4–15.
- Mogil, J. S. (2009). Animal models of pain: progress and challenges. *Nat. Rev. Neurosci.*, 10(4), 283–294.
- Mohapatra, D. P. y Nau, C. (2003). Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.*, 278(50), 50080–50090.
- Mohapatra, D. P. y Nau, C. (2005). Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 280(14), 13424–13432.
- Moilanen, L. J., Laavola, M., Kukkonen, M., Korhonen, R., Leppänen, T., Högestätt, E. D. y col. (2012). TRPA1 contributes to the acute inflammatory response and mediates carrageenan-induced paw edema in the mouse. *Sci. Rep.*, 2, 380.
- Momiyama, A. (2000). Distinct synaptic and extrasynaptic NMDA receptors identified in dorsal horn neurones of the adult rat spinal cord. *J. Physiol.*, 523 Pt 3, 621–628.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B. y Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12(3), 529–540.
- Morre, M., Bachy, A., Gout, B., Boigegrain, R., Arnone, M. y Roncucci, R. (1983). Kappa binding sites in guinea-pig brain membranes: evidence for a dynorphin-resistant subtype. *Life Sci.*, 33 Suppl 1, 179–182.
- Mosca, T. J., Hong, W., Dani, V. S., Favaloro, V. y Luo, L. (2012). Trans-synaptic Teneurin signalling in neuromuscular synapse organization and target choice. *Nature*, 484(7393), 237–241.
- Mozier, N. M., Walsh, M. P. y Pearson, J. D. (1991). Characterization of a novel zinc binding site of protein kinase C inhibitor-1. *FEBS Lett.*, 279(1), 14–18.
- Mukhopadhyay, D. y Dasso, M. (2007). Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem. Sci.*, 32(6), 286–295.
- Mukhopadhyay, S., Shim, J.-Y., Assi, A.-A., Norford, D. y Howlett, A. C. (2002). CB(1) cannabinoid receptor-G protein association: a possible mechanism for differential signaling. *Chem. Phys. Lipids*, 121(1-2), 91–109.

- Nagata, K., Duggan, A., Kumar, G. y García-Añoveros, J. (2005). Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J. Neurosci.*, 25(16), 4052–4061.
- Nakazawa, K. y Sapkota, K. (2020). The origin of NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Pharmacol. Ther.*, 205, 107426.
- Nakazawa, K., McHugh, T. J., Wilson, M. A. y Tonegawa, S. (2004). NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5(5), 361–372.
- Namer, B., Seifert, F., Handwerker, H. O. y Maihöfner, C. (2005). TRPA1 and TRPM8 activation in humans: effects of cinnamaldehyde and menthol. *Neuroreport*, 16(9), 955–959.
- Narita, M., Hashimoto, K., Amano, T., Narita, M., Niikura, K., Nakamura, A. y Suzuki, T. (2008). Post-synaptic action of morphine on glutamatergic neuronal transmission related to the descending antinociceptive pathway in the rat thalamus. *J. Neurochem.*, 104(2), 469–478.
- Naughton, M., Clarke, G., O'Leary, O. F., Cryan, J. F. y Dinan, T. G. (2014). A review of ketamine in affective disorders: current evidence of clinical efficacy, limitations of use and pre-clinical evidence on proposed mechanisms of action. *J. Affect. Disord.*, 156, 24–35.
- Navarro, G., Moreno, E., Aymerich, M., Marcellino, D., McCormick, P. J., Mallol, J. y col. (2010). Direct involvement of sigma-1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107(43), 18676–18681.
- Nelson, K. K. y Melendez, J. A. (2004). Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic. Biol. Med.*, 37(6), 768–784.
- New, D. C., Wu, K., Kwok, A. W. y Wong, Y. H. (2007). G protein-coupled receptor-induced Akt activity in cellular proliferation and apoptosis. *FEBS J.*, 274(23), 6025–6036.
- Nguyen, T.-L., Nam, Y.-S., Lee, S.-Y., Kim, H.-C. y Jang, C.-G. (2010). Effects of capsazepine, a transient receptor potential vanilloid type 1 antagonist, on morphine-induced antinociception, tolerance, and dependence in mice. *Br. J. Anaesth.*, 105(5), 668–674.
- Nilius, B. (2007). TRP channels in disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1772(8), 805–812.
- Nilius, B., Appendino, G. y Owsianik, G. (2012). The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. *Pflugers Arch.*, 464(5), 425–458.
- Nishi, M., Takeshima, H., Fukuda, K., Kato, S. y Mori, K. (1993). cDNA cloning and pharmacological characterization of an opioid receptor with high affinities for kappa-subtype-selective ligands. *FEBS Lett.*, 330(1), 77–80.
- Numazaki, M., Tominaga, T., Takeuchi, K., Murayama, N., Toyooka, H. y Tominaga, M. (2003). Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100(13), 8002–8006.

- Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H. y Tominaga, M. (2002). Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J. Biol. Chem.*, 277(16), 13375–13378.
- Nunes, S. M., Ferralli, J., Choi, K., Brown-Luedi, M., Minet, A. D. y Chiquet-Ehrismann, R. (2005). The intracellular domain of teneurin-1 interacts with MBD1 and CAP/ponsin resulting in subcellular codistribution and translocation to the nuclear matrix. *Exp. Cell Res.*, 305(1), 122–132.
- Obata, K., Katsura, H., Mizushima, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y. y col. (2005). TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J. Clin. Invest.*, 115(9), 2393–2401.
- O'Brien, J. B., Wilkinson, J. C. y Roman, D. L. (2019). Regulator of G-protein signaling (RGS) proteins as drug targets: Progress and future potentials. *J. Biol. Chem.*, 294(49), 18571–18585.
- Ohnishi, T., Saito, K., Maeda, S., Matsumoto, K., Sakuda, M., & Inoki, R. (1990). Intracerebroventricular treatment of mice with pertussis toxin induces hyperalgesia and enhances 3H-nitrendipine binding to synaptic membranes: similarity with morphine tolerance. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 341(1-2), 123–127.
- Olausson, B. (1998). Recordings of human polymodal single C-fiber afferents following mechanical and argon-laser heat stimulation of inflamed skin. *Exp. Brain Res.*, 122(1), 55–61.
- Ongür, D., Jensen, J. E., Prescott, A. P., Stork, C., Lundy, M., Cohen, B. M. y Renshaw, P. F. (2008). Abnormal glutamatergic neurotransmission and neuronal-glia interactions in acute mania. *Biol. Psychiatry*, 64(8), 718–726.
- Oohashi, T., Zhou, X. H., Feng, K., Richter, B., Mörgelin, M., Perez, M. T. y col. (1999). Mouse ten-m/Odz is a new family of dimeric type II transmembrane proteins expressed in many tissues. *J. Cell Biol.*, 145(3), 563–577.
- Ortíz-Rentería, M., Juárez-Contreras, R., González-Ramírez, R., Islas, L. D., Sierra-Ramírez, F., Llorente, I. y col. (2018). TRPV1 channels and the progesterone receptor Sig-1R interact to regulate pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 115(7), E1657–E1666.
- Ozga, M., Dolot, R., Janicka, M., Kaczmarek, R. y Krakowiak, A. (2010). Histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT-1) phosphoramidase transforms nucleoside 5'-O-phosphorothioates to nucleoside 5'-O-phosphates. *J. Biol. Chem.*, 285(52), 40809–40818.
- Pal, A., Fontanilla, D., Gopalakrishnan, A., Chae, Y.-K., Markley, J. L. y Ruoho, A. E. (2012). The sigma-1 receptor protects against cellular oxidative stress and activates antioxidant response elements. *Eur. J. Pharmacol.*, 682(1-3), 12–20.
- Palmer, G. C. (2001). Neuroprotection by NMDA receptor antagonists in a variety of neuropathologies. *Curr. Drug Targets*, 2(3), 241–271.
- Pan, Y. X., Mei, J., Xu, J., Wan, B. L., Zuckerman, A. y Pasternak, G. W. (1998). Cloning and characterization of a mouse sigma1 receptor. *J. Neurochem.*, 70(6), 2279–2285.

- Paoletti, P., Bellone, C. y Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 14(6), 383–400.
- Park, S. G., Ewalt, K. L. y Kim, S. (2005). Functional expansion of aminoacyl-tRNA synthetases and their interacting factors: new perspectives on housekeepers. *Trends Biochem. Sci.*, 30(10), 569–574.
- Parsons, C. G. y Headley, P. M. (1989). On the selectivity of intravenous mu- and kappa-opioids between nociceptive and non-nociceptive reflexes in the spinalized rat. *Br. J. Pharmacol.*, 98(2), 544–551.
- Pary, R., Matuschka, P. R., Lewis, S. y Lippmann, S. (2006). Managing bipolar depression. *Psychiatry (Edgmont)*, 3(2), 30–41.
- Pasternak, G. W. y Pan, Y.-X. (2013). Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. *Pharmacol. Rev.*, 65(4), 1257–1317.
- Pasternak, G. W. y Wood, P. J. (1986). Multiple mu opiate receptors. *Life Sci.*, 38(21), 1889–1898.
- Patapoutian, A., Tate, S. y Woolf, C. J. (2009). Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 8(1), 55–68.
- Patel, R., Reiss, P., Shetty, H., Broadbent, M., Stewart, R., McGuire, P. y Taylor, M. (2015). Do antidepressants increase the risk of mania and bipolar disorder in people with depression? A retrospective electronic case register cohort study. *BMJ open*, 5(12), e008341.
- Paul, P. y de Belleruche, J. (2014). The role of D-serine and glycine as co-agonists of NMDA receptors in motor neuron degeneration and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Front. Synaptic Neurosci.*, 6, 10.
- Pearson, J. D., DeWald, D. B., Mathews, W. R., Mozier, N. M., Zürcher-Neely, H. A., Heinrikson, R. L. y col. (1990). Amino acid sequence and characterization of a protein inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 265(8), 4583–4591.
- Peeters, K., Chamova, T., Tournev, I. y Jordanova, A. (2017). Axonal neuropathy with neuromyotonia: there is a HINT. *Brain*, 140(4), 868–877.
- Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M. y col. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, 108(5), 705–715.
- Perez-Otano, I., Schulteis, C. T., Contractor, A., Lipton, S. A., Trimmer, J. S., Sucher, N. J. y Heinemann, S. F. (2001). Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J. Neurosci.*, 21(4), 1228–1237.
- Perry, D. K., Smyth, M. J., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Duriez, P., Poirier, G. G., y Hannun, Y. A. (1997). Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 272(30), 18530–18533.

- Petralia, R. S., Wang, Y. X. y Wenthold, R. J. (1994a). The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1. *J. Neurosci.*, *14*(10), 6102–6120.
- Petralia, R. S., Yokotani, N. y Wenthold, R. J. (1994b). Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *J. Neurosci.*, *14*(2), 667–696.
- Poels, E. M., Kegeles, L. S., Kantrowitz, J. T., Slifstein, M., Javitt, D. C., Lieberman, J. A., y col. (2014). Imaging glutamate in schizophrenia: review of findings and implications for drug discovery. *Mol. Psychiatry*, *19*(1), 20–29.
- Polter, A., Beurel, E., Yang, S., Garner, R., Song, L., Miller, C. A. y col. (2010). Deficiency in the inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 increases sensitivity to mood disturbances. *Neuropsychopharmacology*, *35*(8), 1761–1774.
- Porsolt, R. D., Bertin, A. y Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, *229*(2), 327–336.
- Prasad, P., Yanagihara, A. A., Small-Howard, A. L., Turner, H. y Stokes, A. J. (2008). Secretogranin III directs secretory vesicle biogenesis in mast cells in a manner dependent upon interaction with chromogranin A. *J. Immunol.*, *181*(7), 5024–5034.
- Proudfoot, C. J., Garry, E. M., Cottrell, D. F., Rosie, R., Anderson, H., Robertson, D. C. y col. (2006). Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Curr. Biol.*, *16*(16), 1591–1605.
- Puig, M. y Montes, A. (1998). Opioids: From receptors to clinical application. *Curr. Pain*, *2*, 234-241.
- Rauchenzauner, M., Frühwirth, M., Hecht, M., Kofler, M., Witsch-Baumgartner, M. y Fauth, C. (2016). A Novel Variant in the HINT1 Gene in a Girl with Autosomal Recessive Axonal Neuropathy with Neuromyotonia: Thorough Neurological Examination Gives the Clue. *Neuropediatrics*, *47*(2), 119–122.
- Robillard, L., Ethier, N., Lachance, M. y Hébert, T. E. (2000). Gbetagamma subunit combinations differentially modulate receptor and effector coupling in vivo. *Cell. Signal.*, *12*(9-10), 673–682.
- Robinson, K. y Aitken, A. (1994). Identification of a new protein family which includes bovine protein kinase C inhibitor-1. *Biochem. J.*, *304* (Pt 2), 662–664.
- Robson, M. J., Noorbakhsh, B., Seminerio, M. J. y Matsumoto, R. R. (2012). Sigma-1 receptors: potential targets for the treatment of substance abuse. *Curr. Pharm. Des.*, *18*(7), 902–919.
- Rodríguez-Muñoz, M. y Garzón, J. (2013). Nitric oxide and zinc-mediated protein assemblies involved in mu opioid receptor signaling. *Mol. Neurobiol.*, *48*(3), 769–782.
- Rodríguez-Muñoz, M., Bermúdez, D., Sánchez-Blázquez, P. y Garzón, J. (2007a). Sumoylated RGS-Rz proteins act as scaffolds for Mu-opioid receptors and G-protein complexes in mouse brain. *Neuropsychopharmacology*, *32*(4), 842–850.

- Rodríguez-Muñoz, M., Cortés-Montero, E., Garzón-Niño, J. y Sánchez-Blázquez, P. (2020). The ALS-related $\sigma 1$ R E102Q Mutant Eludes Ligand Control and Exhibits Anomalous Response to Calcium. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(19).
- Rodríguez-Muñoz, M., Cortés-Montero, E., Pozo-Rodríguez, A., Sánchez-Blázquez, P. y Garzón-Niño, J. (2015b). The ON:OFF switch, $\sigma 1$ R-HINT1 protein, controls GPCR-NMDA receptor cross-regulation: implications in neurological disorders. *Oncotarget*, 6(34), 35458–35477.
- Rodríguez-Muñoz, M., de la Torre-Madrid, E., Sánchez-Blázquez, P. y Garzón, J. (2007b). Morphine induces endocytosis of neuronal mu-opioid receptors through the sustained transfer of Galpha subunits to RGS2 proteins. *Mol. Pain*, 3, 19.
- Rodríguez-Muñoz, M., de la Torre-Madrid, E., Sánchez-Blázquez, P. y Garzón, J. (2011b). NO-released zinc supports the simultaneous binding of Raf-1 and PKC γ cysteine-rich domains to HINT1 protein at the mu-opioid receptor. *Antioxid. Redox Signal.*, 14(12), 2413–2425.
- Rodríguez-Muñoz, M., de la Torre-Madrid, E., Sánchez-Blázquez, P., Wang, J. B. y Garzón, J. (2008). NMDAR-nNOS generated zinc recruits PKC γ to the HINT1-RGS17 complex bound to the C terminus of Mu-opioid receptors. *Cell. Signal.* 20(10), 1855–1864.
- Rodríguez-Muñoz, M., Sánchez-Blázquez, P. y Garzón, J. (2018). Fenfluramine diminishes NMDA receptor-mediated seizures via its mixed activity at serotonin 5HT_{2A} and type 1 sigma receptors. *Oncotarget*, 9(34), 23373–23389.
- Rodríguez-Muñoz, M., Sánchez-Blázquez, P., Callado, L. F., Meana, J. J. y Garzón-Niño, J. (2017). Schizophrenia and depression, two poles of endocannabinoid system deregulation. *Transl. Psychiatry*, 7(12), 1291.
- Rodríguez-Muñoz, M., Sánchez-Blázquez, P., Herrero-Labrador, R., Martínez-Murillo, R., Merlos, M., Vela, J. M. y Garzón, J. (2015a). The $\sigma 1$ receptor engages the redox-regulated HINT1 protein to bring opioid analgesia under NMDA receptor negative control. *Antioxid. Redox. Signal.*, 22(10), 799–818.
- Rodríguez-Muñoz, M., Sánchez-Blázquez, P., Vicente-Sánchez, A., Bailón, C., Martín-Aznar, B. y Garzón, J. (2011a). The histidine triad nucleotide-binding protein 1 supports mu-opioid receptor-glutamate NMDA receptor cross-regulation. *Cell. Mol. Life Sci.*, 68(17), 2933–2949.
- Rodríguez-Muñoz, M., Sánchez-Blázquez, P., Vicente-Sánchez, A., Berrocoso, E. y Garzón, J. (2012). The mu-opioid receptor and the NMDA receptor associate in PAG neurons: implications in pain control. *Neuropsychopharmacology*, 37(2), 338–349.
- Romanova, E. V., Lee, J. E., Kelleher, N. L., Sweedler, J. V. y Gulley, J. M. (2010). Mass spectrometry screening reveals peptides modulated differentially in the medial prefrontal cortex of rats with disparate initial sensitivity to cocaine. *AAPS J.*, 12(3), 443–454.

- Romero, L., Zamanillo, D., Nadal, X., Sánchez-Arroyos, R., Rivera-Arconada, I., Dordal, A. y col. (2012). Pharmacological properties of S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization. *Br. J. Pharmacology*, 166(8), 2289–2306.
- Rosenbaum, T., Gordon-Shaag, A., Munari, M. y Gordon, S. E. (2004). Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J. Gen. Physiol.*, 123(1), 53–62.
- Rossor, A. M., Kalmar, B., Greensmith, L. y Reilly, M. M. (2012). The distal hereditary motor neuropathies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 83(1), 6–14.
- Rottbauer, W., Saurin, A. J., Lickert, H., Shen, X., Burns, C. G., Wo, Z. G. y col. (2002). Reptin and pontin antagonistically regulate heart growth in zebrafish embryos. *Cell*, 111(5), 661–672.
- Rowbotham, M. C., Nothaft, W., Duan, R. W., Wang, Y., Faltynek, C., McGaraughty, S. y col. (2011). Oral and cutaneous thermosensory profile of selective TRPV1 inhibition by ABT-102 in a randomized healthy volunteer trial. *Pain*, 152(5), 1192–1200.
- Rusin, K. I. y Randić, M. (1991). Modulation of NMDA-induced currents by mu-opioid receptor agonist DAGO in acutely isolated rat spinal dorsal horn neurons. *Neurosci. Lett.*, 124(2), 208–212.
- Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I., Manabe, T., Takayama, C., Kushiya, E. y col. (1995). Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature*, 373(6510), 151–155.
- Salas, M. M., Hargreaves, K. M. y Akopian, A. N. (2009). TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. *Eur. J. Neurosci.* 29(8), 1568–1578.
- Salazar, H., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., García-Villegas, R., Munari, M., Gordon, S. E. y col. (2008). A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nat. Neurosci.*, 11(3), 255–261.
- Salter, M. W. (2005). Cellular signalling pathways of spinal pain neuroplasticity as targets for analgesic development. *Curr. Top. Med. Chem.*, 5(6), 557–567.
- Samanta, A., Hughes, T. E. y Moiseenkova-Bell, V. Y. (2018). Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Subcell. Biochem.*, 87, 141–165.
- Sánchez-Blázquez, P. y Garzón, J. (1988). Pertussis toxin differentially reduces the efficacy of opioids to produce supraspinal analgesia in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.*, 152(3), 357–361.
- Sánchez-Blázquez, P., Cortés-Montero, E., Rodríguez-Muñoz, M., Merlos, M. y Garzón-Niño, J. (2020). The Sigma 2 receptor promotes and the Sigma 1 receptor inhibits mu-opioid receptor-mediated antinociception. *Mol. Brain*, 13(1), 150.
- Sánchez-Blázquez, P., Gómez-Serranillos, P. y Garzón, J. (2001). Agonists determine the pattern of G-protein activation in mu-opioid receptor-mediated supraspinal analgesia. *Brain Res. Bull.*, 54(2), 229–235.

- Sánchez-Blázquez, P., Pozo-Rodrigálvarez, A., Merlos, M. y Garzón, J. (2018). The Sigma-1 Receptor Antagonist, SIRA, Reduces Stroke Damage, Ameliorates Post-Stroke Neurological Deficits and Suppresses the Overexpression of MMP-9. *Mol. Neurobiol.*, 55(6), 4940–4951.
- Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Díaz, M., DeAntonio, I. y Garzón, J. (1999). Endomorphin-1 and endomorphin-2 show differences in their activation of mu opioid receptor-regulated G proteins in supraspinal antinociception in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 291(1), 12–18.
- Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M. y Garzón, J. (2014). The cannabinoid receptor 1 associates with NMDA receptors to produce glutamatergic hypofunction: implications in psychosis and schizophrenia. *Front. Pharmacol.*, 4, 169.
- Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M., Bailón, C. y Garzón, J. (2012). GPCRs promote the release of zinc ions mediated by nNOS/NO and the redox transducer RGSZ2 protein. *Antioxid. Redox. Signal.* 17(9), 1163–1177.
- Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M., Berrocoso, E. y Garzón, J. (2013). The plasticity of the association between mu-opioid receptor and glutamate ionotropic receptor N in opioid analgesic tolerance and neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, 716(1-3), 94–105.
- Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M., Herrero-Labrador, R., Burgueño, J., Zamanillo, D. y Garzón, J. (2014). The calcium-sensitive Sigma-1 receptor prevents cannabinoids from provoking glutamate NMDA receptor hypofunction: implications in antinociception and psychotic diseases. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 17(12), 1943–1955.
- Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M., Montero, C., de la Torre-Madrid, E. y Garzón, J. (2008). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II supports morphine antinociceptive tolerance by phosphorylation of glycosylated phospholipase-like protein. *Neuropharmacol.*, 54(2), 319–330.
- Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M., Vicente-Sánchez, A. y Garzón, J. (2013). Cannabinoid receptors couple to NMDA receptors to reduce the production of NO and the mobilization of zinc induced by glutamate. *Antioxid. Redox. Signal.*, 19(15), 1766–1782.
- Sarria, I., Ling, J., Zhu, M. X. y Gu, J. G. (2011). TRPM8 acute desensitization is mediated by calmodulin and requires PIP(2): distinction from tachyphylaxis. *J. Neurophysiol.*, 106(6), 3056–3066.
- Sasabe, J., Chiba, T., Yamada, M., Okamoto, K., Nishimoto, I., Matsuoka, M. y Aiso, S. (2007). D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J.*, 26(18), 4149–4159.
- Sasaki, Y. F., Rothe, T., Premkumar, L. S., Das, S., Cui, J., Talantova, M. V. y col. (2002). Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *J. Neurophysiol.* 87(4), 2052–2063.

Scherer, P. C., Zaccor, N. W., Neumann, N. M., Vasavda, C., Barrow, R., Ewald, A. J. y col. (2017). TRPV1 is a physiological regulator of μ -opioid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 114(51), 13561–13566.

Schmidt, J. T., Fleming, M. R. y Leu, B. (2004). Presynaptic protein kinase C controls maturation and branch dynamics of developing retinotectal arbors: possible role in activity-driven sharpening. *J. Neurobiol.*, 58(3), 328–340.

Schmidt, M., Dubin, A. E., Petrus, M. J., Earley, T. J. y Patapoutian, A. (2009). Nociceptive signals induce trafficking of TRPA1 to the plasma membrane. *Neuron*, 64(4), 498–509.

Schöler, J., Ferralli, J., Thiry, S. y Chiquet-Ehrismann, R. (2015). The intracellular domain of teneurin-1 induces the activity of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) by binding to transcriptional repressor HINT1. *J. Biol. Chem.*, 290(13), 8154–8165.

Schulz, S., Chachami, G., Kozaczekiewicz, L., Winter, U., Stankovic-Valentin, N., Haas, P. y col. (2012). Ubiquitin-specific protease-like 1 (USPL1) is a SUMO isopeptidase with essential, non-catalytic functions. *EMBO Rep.*, 13(10), 930–938.

Seburn, K. L., Morelli, K. H., Jordanova, A. y Burgess, R. W. (2014). Lack of neuropathy-related phenotypes in hint1 knockout mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 73(7), 693–701.

Seeburg, P. H., Burnashev, N., Köhr, G., Kuner, T., Sprengel, R. y Monyer, H. (1995). The NMDA receptor channel: molecular design of a coincidence detector. *Recent Prog. Horm. Res.*, 50, 19–34.

Senese, N. B., Kandasamy, R., Kochan, K. E. y Traynor, J. R. (2020). Regulator of G-Protein Signaling (RGS) Protein Modulation of Opioid Receptor Signaling as a Potential Target for Pain Management. *Front. Mol. Neurosci.*, 13, 5.

Séraphin, B. (1992). The HIT protein family: a new family of proteins present in prokaryotes, yeast and mammals. *DNA Seq.*, 3(3), 177–179.

Serra, G., Koukopoulos, A., De Chiara, L., Koukopoulos, A. E., Tondo, L., Girardi, P. y col. (2015). Three-year, naturalistic, mirror-image assessment of adding memantine to the treatment of 30 treatment-resistant patients with bipolar disorder. *J. Clin. Psychiatry*, 76(1), e91–e97.

Shah, R. M., Maize, K. M., West, H. T., Strom, A. M., Finzel, B. C. y Wagner, C. R. (2018). Structure and Functional Characterization of Human Histidine Triad Nucleotide-Binding Protein 1 Mutations Associated with Inherited Axonal Neuropathy with Neuromyotonia. *J. Mol. Biol.*, 430(17), 2709–2721.

Shah, R. M., Peterson, C., Strom, A., Dillenburg, M., Finzel, B., Kitto, K. F. y Wagner, C. R. (2019). Inhibition of HINT1 Modulates Spinal Nociception and NMDA Evoked Behavior in Mice. *ACS Chem. Neurosci.*, 10(10), 4385–4393.

Shah, R., Chou, T.-F., Maize, K. M., Strom, A., Finzel, B. C. y Wagner, C. R. (2017). Inhibition by divalent metal ions of human histidine triad nucleotide binding protein1 (hHint1), a regulator of opioid analgesia and neuropathic pain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 491(3), 760–766.

- Shahani, N. y Sawa, A. (2011). Nitric oxide signaling and nitrosative stress in neurons: role for S-nitrosylation. *Antioxid. Redox. Signal.*, 14(8), 1493–1504.
- Shapovalov, G., Gkika, D., Devilliers, M., Kondratskyi, A., Gordienko, D., Busserolles, J. y col. (2013). Opiates modulate thermosensation by internalizing cold receptor TRPM8. *Cell Rep.*, 4(3), 504–515.
- Sheng, M., Cummings, J., Roldan, L. A., Jan, Y. N. y Jan, L. Y. (1994). Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature*, 368(6467), 144–147.
- Shin, E. J., Shin, H. M., Nam, E., Kim, W. S., Kim, J.-H., Oh, B.-H. y Yun, Y. (2012). DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease. *EMBO Rep.*, 13(4), 339–346.
- Sigtermans, M. J., van Hilten, J. J., Bauer, M. C., Arbous, S. M., Marinus, J., Sarton, E. Y. y Dahan, A. (2009). Ketamine produces effective and long-term pain relief in patients with Complex Regional Pain Syndrome Type 1. *Pain*, 145(3), 304–311.
- Singh, J., Salcius, M., Liu, S.-W., Staker, B. L., Mishra, R., Thurmond, J., Gurney, M. E. (2008). DcpS as a therapeutic target for spinal muscular atrophy. *ACS Chem. Biol.*, 3(11), 711–722.
- Smart, D. y Lambert, D. G. (1996). delta-Opioids stimulate inositol 1,4,5-trisphosphate formation, and so mobilize Ca²⁺ from intracellular stores, in undifferentiated NG108-15 cells. *J. Neurochem.*, 66(4), 1462–1467.
- Smart, D., Hirst, R. A., Hirota, K., Grandy, D. K. y Lambert, D. G. (1997). The effects of recombinant rat mu-opioid receptor activation in CHO cells on phospholipase C, [Ca²⁺]_i and adenylyl cyclase. *Br. J. Pharmacol.*, 120(6), 1165–1171.
- Smith, F. L., Dombrowski, D. S. y Dewey, W. L. (1999a). Involvement of intracellular calcium in morphine tolerance in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 62(2), 381–388.
- Smith, F. L., Lohmann, A. B. y Dewey, W. L. (1999b). Involvement of phospholipid signal transduction pathways in morphine tolerance in mice. *Br. J. Pharmacol.*, 128(1), 220–226.
- Sofuoglu, M., Portoghese, P. S. y Takemori, A. E. (1991). Cross-tolerance studies in the spinal cord of beta-FNA-treated mice provides further evidence for delta opioid receptor subtypes. *Life Sci.*, 49(19), PL153–PL156.
- Song, I. y Huganir, R. L. (2002). Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci.*, 25(11), 578–588.
- Spahn, V., Stein, C., y Zöllner, C. (2014). Modulation of transient receptor vanilloid 1 activity by transient receptor potential ankyrin 1. *Mol. Pharmacol.*, 85(2), 335–344.
- Spiegel, K., Kourides, I. A. y Pasternak, G. W. (1982). Prolactin and growth hormone release by morphine in the rat: different receptor mechanisms. *Science*, 217(4561), 745–747.

- Stahl, S. (2013). *Stahl's essential psychopharmacology : neuroscientific basis and practical application*. Cambridge New York: Cambridge University Press.
- Stanasila, L., Lim, W. K., Neubig, R. R. y Pattus, F. (2000). Coupling efficacy and selectivity of the human mu-opioid receptor expressed as receptor-Galpa fusion proteins in *Escherichia coli*. *J. Neurochem.*, 75(3), 1190–1199.
- Standley, S., Roche, K. W., McCallum, J., Sans, N. y Wenthold, R. J. (2000). PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron*, 28(3), 887–898.
- Staruschenko, A., Jeske, N. A. y Akopian, A. N. (2010). Contribution of TRPV1-TRPA1 interaction to the single channel properties of the TRPA1 channel. *J. Biol. Chem.*, 285(20), 15167–15177.
- Stefano, G. B., Digenis, A., Spector, S., Leung, M. K., Bilfinger, T. V., Makman, M. H. y col. (1993). Opiate-like substances in an invertebrate, an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90(23), 11099–11103.
- Stein, C. (2016). Opioid Receptors. *Ann. Rev. Med.*, 67, 433–451.
- Stein, C. (2018). New concepts in opioid analgesia. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 27(10), 765–775.
- Stein, C. y Lang, L. J. (2009). Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 9(1), 3–8.
- Stewart, P. E. y Hammond, D. L. (1993). Evidence for delta opioid receptor subtypes in rat spinal cord: studies with intrathecal naltriben, cyclic[D-Pen2, D-Pen5] enkephalin and [D-Ala2, Glu4]deltorphin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 266(2), 820–828.
- Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R. y col. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*, 112(6), 819–829.
- Straub, R. E., MacLean, C. J., O'Neill, F. A., Walsh, D. y Kendler, K. S. (1997). Support for a possible schizophrenia vulnerability locus in region 5q22-31 in Irish families. *Mol. Psychiatry*, 2(2), 148–155.
- Su, L., Wang, C., Yu, Y.-H., Ren, Y.-Y., Xie, K.-L. y Wang, G.-L. (2011). Role of TRPM8 in dorsal root ganglion in nerve injury-induced chronic pain. *BMC Neurosci.*, 12, 120.
- Su, T., Suzui, M., Wang, L., Lin, C.-S., Xing, W.-Q. y Weinstein, I. B. (2003). Deletion of histidine triad nucleotide-binding protein 1/PKC-interacting protein in mice enhances cell growth and carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100(13), 7824–7829.
- Suh, H.-Y., Kim, J.-H., Woo, J.-S., Ku, B., Shin, E. J., Yun, Y. y Oh, B.-H. (2012). Crystal structure of DeSI-1, a novel deSUMOylase belonging to a putative isopeptidase superfamily. *Proteins*, 80(8), 2099–2104.

- Sulak, M. A., Ghosh, M., Sinharoy, P., Andrei, S. R. y Damron, D. S. (2018). Modulation of TRPA1 channel activity by Cdk5 in sensory neurons. *Channels (Austin)*, 12(1), 65–75.
- Sulpizi, M., Rothlisberger, U. y Carloni, P. (2003). Molecular dynamics studies of caspase-3. *Biophys. J.*, 84(4), 2207–2215.
- Sun, L., Youn, H. D., Loh, C., Stolow, M., He, W. y Liu, J. O. (1998). Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity*, 8(6), 703–711.
- Sura, L., Zíma, V., Marsakova, L., Hynkova, A., Barvík, I. y Vlachova, V. (2012). C-terminal acidic cluster is involved in Ca²⁺-induced regulation of human transient receptor potential ankyrin 1 channel. *J. Biol. Chem.*, 287(22), 18067–18077.
- Suzuki, N., Fukushi, M., Kosaki, K., Doyle, A. D., de Vega, S., Yoshizaki, K. y col. (2012). Teneurin-4 is a novel regulator of oligodendrocyte differentiation and myelination of small-diameter axons in the CNS. *J. Neurosci.*, 32(34), 11586–11599.
- Szallasi, A. y Blumberg, P. M. (1999). Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.*, 51(2), 159–212.
- Szallasi, A., Cortright, D. N., Blum, C. A., & Eid, S. R. (5 de 2007). The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nature reviews. Drug discovery*, 6(5), 357–372. doi:10.1038/nrd2280
- Szolcsányi, J. (1977). A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. *J. Physiol. (París)*, 73(3), 251–259.
- Szolcsányi, J. y Sándor, Z. (2012). Multiteric TRPV1 nocisensor: a target for analgesics. *Trends Pharmacol. Sci.*, 33(12), 646–655.
- Szolcsányi, J., Joó, F. y Jancsó-Gábor, A. (1971). Mitochondrial changes in preoptic neurons after capsaicin desensitization of the hypothalamic thermodetectors in rats. *Nature*, 229(5280), 116–117.
- Takahashi, N., Kuwaki, T., Kiyonaka, S., Numata, T., Kozai, D., Mizuno, Y. y col. (2011). TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂. *Nat. Chem. Biol.*, 7(10), 701–711.
- Tan, L. A., Xu, K., Vaccarino, F. J., Lovejoy, D. A. y Rotzinger, S. (2009). Teneurin C-terminal associated peptide (TCAP)-1 attenuates corticotropin-releasing factor (CRF)-induced c-Fos expression in the limbic system and modulates anxiety behavior in male Wistar rats. *Behav. Brain Res.*, 201(1), 198–206.
- Tani, M., Yazawa, I., Ikeda, K., Kawakami, K. y Onimaru, H. (2015). Long-lasting facilitation of respiratory rhythm by treatment with TRPA1 agonist, cinnamaldehyde. *J. Neurophysiol.*, 114(2), 989–998.
- Tejada, M. A., Montilla-García, A., Cronin, S. J., Cikes, D., Sánchez-Fernández, C., González-Cano, R. y col. (2017). Sigma-1 receptors control immune-driven peripheral opioid analgesia during inflammation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 114(31), 8396–8401.

- Thompson, G. L., Lane, J. R., Coudrat, T., Sexton, P. M., Christopoulos, A. y Canals, M. (2015). Biased Agonism of Endogenous Opioid Peptides at the μ -Opioid Receptor. *Mol. Pharmacol.*, 88(2), 335–346.
- Tingley, W. G., Ehlers, M. D., Kameyama, K., Doherty, C., Ptak, J. B., Riley, C. T. Huganir, R. L. (1997). Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J. Biol. Chem.*, 272(8), 5157–5166.
- Tingley, W. G., Roche, K. W., Thompson, A. K. y Huganir, R. L. (1993). Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature*, 364(6432), 70–73.
- Tölle, T. R., Berthele, A., Laurie, D. J., Seeburg, P. H. y Zieglgänsberger, W. (1995). Cellular and subcellular distribution of NMDAR1 splice variant mRNA in the rat lumbar spinal cord. *Eur. J. Neurosci.*, 7(6), 1235–1244.
- Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K. y col. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, 21(3), 531–543.
- Trapaidze, N., Keith, D. E., Cvejic, S., Evans, C. J. y Devi, L. A. (1996). Sequestration of the delta opioid receptor. Role of the C terminus in agonist-mediated internalization. *J. Biol. Chem.*, 271(46), 29279–29285.
- Trapasso, F., Krakowiak, A., Cesari, R., Arkles, J., Yendamuri, S., Ishii, H. y col. (2003). Designed FHIT alleles establish that Fhit-induced apoptosis in cancer cells is limited by substrate binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100(4), 1592–1597.
- Trapasso, F., Pichiorri, F., Gaspari, M., Palumbo, T., Aqeilan, R. I., Gaudio, E. y col. (2008). Fhit interaction with ferredoxin reductase triggers generation of reactive oxygen species and apoptosis of cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 283(20), 13736–13744.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K. y col. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.*, 62(3), 405–496.
- Trujillo, K. A. (2002). The neurobiology of opiate tolerance, dependence and sensitization: mechanisms of NMDA receptor-dependent synaptic plasticity. *Neurotox. Res.*, 4(4), 373–391.
- Truong, W., Cheng, C., Xu, Q.-G., Li, X.-Q. y Zochodne, D. W. (2003). Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury. *Ann. Neurol.*, 53(3), 366–375.
- Tsai, S.-Y. A., Chuang, J.-Y., Tsai, M.-S., Wang, X.-F., Xi, Z.-X., Hung, J.-J. y col. (2015). Sigma-1 receptor mediates cocaine-induced transcriptional regulation by recruiting chromatin-remodeling factors at the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 112(47), E6562–E6570.

- Tsavalier, L., Shapero, M. H., Morkowski, S. y Laus, R. (2001). Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res.*, 61(9), 3760–3769.
- Tucker, R. P. y Chiquet-Ehrismann, R. (2006). Teneurins: a conserved family of transmembrane proteins involved in intercellular signaling during development. *Dev. Biol.*, 290(2), 237–245.
- Turnock-Jones, J. J., Jennings, C. A., Robbins, M. J., Cluderay, J. E., Cilia, J., Reid, J. L. y col. (2009). Increased expression of the NR2A NMDA receptor subunit in the prefrontal cortex of rats reared in isolation. *Synapse*, 63(10), 836–846.
- Tyagi, S. C., Kumar, S. y Borders, S. (1996). Reduction-oxidation (redox) state regulation of extracellular matrix metalloproteinases and tissue inhibitors in cardiac normal and transformed fibroblast cells. *J. Cell. Biochem.*, 61(1), 139–151.
- Tyszkiewicz, J. P., Gu, Z., Wang, X., Cai, X. y Yan, Z. (2004). Group II metabotropic glutamate receptors enhance NMDA receptor currents via a protein kinase C-dependent mechanism in pyramidal neurones of rat prefrontal cortex. *J. Physiol.*, 554(Pt 3), 765–777.
- Ullah, M. I., Ahmad, A., Raza, S. I., Amar, A., Ali, A., Bhatti, A. y col. (2015). In silico analysis of SIGMAR1 variant (rs4879809) segregating in a consanguineous Pakistani family showing amyotrophic lateral sclerosis without frontotemporal lobar dementia. *Neurogenetics*, 16(4), 299–306.
- Valente, P., García-Sanz, N., Gomis, A., Fernández-Carvajal, A., Fernández-Ballester, G., Viana, F. y col. (2008). Identification of molecular determinants of channel gating in the transient receptor potential box of vanilloid receptor I. *FASEB J.*, 22(9), 3298–3309.
- Vallat, J.-M., Mathis, S. y Funalot, B. (2013). The various Charcot-Marie-Tooth diseases. *Curr. Opin. Neurol.*, 26(5), 473–480.
- Varadarajulu, J., Lebar, M., Krishnamoorthy, G., Habelt, S., Lu, J., Bernard Weinstein y col. (2011). Increased anxiety-related behaviour in Hint1 knockout mice. *Behav. Brain Res.*, 220(2), 305–311.
- Varadarajulu, J., Schmitt, A., Falkai, P., Alsaif, M., Turck, C. W. y Martins-de-Souza, D. (2012). Differential expression of HINT1 in schizophrenia brain tissue. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, 262(2), 167–172.
- Vardanyan, A., Wang, R., Vanderah, T., Ossipov, M., Lai, J., Porreca, F. y King, T. (2009). TRPV1 receptor in expression of opioid-induced hyperalgesia. *J. Pain*, 10(3), 243–252.
- Vawter, M. P., Crook, J. M., Hyde, T. M., Kleinman, J. E., Weinberger, D. R., Becker, K. G. y Freed, W. J. (2002). Microarray analysis of gene expression in the prefrontal cortex in schizophrenia: a preliminary study. *Schizophrenia Res.*, 58(1), 11–20.
- Vawter, M. P., Shannon Weickert, C., Ferran, E., Matsumoto, M., Overman, K., Hyde, T. M. y col. (2004). Gene expression of metabolic enzymes and a protease inhibitor in the prefrontal cortex are decreased in schizophrenia. *Neurochem. Res.*, 29(6), 1245–1255.

Vicente-Sánchez, A., Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M. y Garzón, J. (2013). HINT1 protein cooperates with cannabinoid 1 receptor to negatively regulate glutamate NMDA receptor activity. *Mol. Brain*, 6, 42.

Vidal-Torres, A., de la Puente, B., Rocasalbas, M., Touriño, C., Bura, S. A., Fernández-Pastor, B. y col. (2013). Sigma-1 receptor antagonism as opioid adjuvant strategy: enhancement of opioid antinociception without increasing adverse effects. *Eur. J. Pharmacol.*, 711(1-3), 63–72.

Vlachová, V., Teisinger, J., Susánková, K., Lyfenko, A., Ettrich, R. y Vyklický, L. (2003). Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J. Neurosci.*, 23(4), 1340–1350.

Voets, T., Owsianik, G., Janssens, A., Talavera, K. y Nilius, B. (2007). TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli. *Nat. Chem. Biol.*, 3(3), 174–182.

Walker, K. M., Urban, L., Medhurst, S. J., Patel, S., Panesar, M., Fox, A. J. y McIntyre, P. (2003). The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J. Pharmacology Exp. Ther.*, 304(1), 56–62.

Wang, H., Gracy, K. N. y Pickel, V. M. (1999). Mu-opioid and NMDA-type glutamate receptors are often colocalized in spiny neurons within patches of the caudate-putamen nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 412(1), 132–146.

Wang, H., Wu, J., Meng, X., Ying, X., Zuo, Y., Liu, R. y col. (2011). MicroRNA-342 inhibits colorectal cancer cell proliferation and invasion by directly targeting DNA methyltransferase 1. *Carcinogenesis*, 32(7), 1033–1042.

Wang, J. B., Johnson, P. S., Persico, A. M., Hawkins, A. L., Griffin, C. A. y Uhl, G. R. (1994). Human mu opiate receptor. cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FEBS Lett.*, 338(2), 217–222.

Wang, J., Ducret, A., Tu, Y., Kozasa, T., Aebersold, R. y Ross, E. M. (1998). RGSZ1, a Gz-selective RGS protein in brain. Structure, membrane association, regulation by Galphaz phosphorylation, and relationship to a Gz gtpase-activating protein subfamily. *J. Biol. Chem.*, 273(40), 26014–26025.

Wang, L., Li, H., Zhang, Y., Santella, R. M. y Weinstein, I. B. (2009). HINT1 inhibits beta-catenin/TCF4, USF2 and NFkappaB activity in human hepatoma cells. *Int. J. Cancer.*, 124(7), 1526–1534.

Wang, L., Zhang, Y., Li, H., Xu, Z., Santella, R. M. y Weinstein, I. B. (2007). Hint1 inhibits growth and activator protein-1 activity in human colon cancer cells. *Cancer Res.*, 67(10), 4700–4708.

Wang, Y. Y., Chang, R. B., Waters, H. N., McKemy, D. D., & Liman, E. R. (2008). The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions. *J. Biol. Chem.*, 283(47), 32691–32703.


- Wang, Z., Lin, J., Qiao, K., Cai, S., Zhang, V. W., Zhao, C. y Lu, J. (2019). Novel mutations in HINT1 gene cause the autosomal recessive axonal neuropathy with neuromyotonia. *Eur. Med. Genet.*, 62(3), 190–194.
- Warren, J. T., Guo, Q. y Tang, W.-J. (2007). A 1.3-Å structure of zinc-bound N-terminal domain of calmodulin elucidates potential early ion-binding step. *J. Mol. Biol.*, 374(2), 517–527.
- Watanabe, S., Ilieva, H., Tamada, H., Nomura, H., Komine, O., Endo, F. y col. (2016). Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in SIGMAR1- and SOD1-linked ALS. *EMBO Mol. Med.*, 8(12), 1421–1437.
- Wei, X., Zhou, J., Hong, L., Xu, Z., Zhao, H., Wu, X. y Chen, J. (2018). Hint1 expression inhibits proliferation and promotes radiosensitivity of human SGC7901 gastric cancer cells. *Oncology Lett.*, 16(2), 2135–2142.
- Weiske, J. y Huber, O. (2005). The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF-beta-catenin-mediated transcription. *J. Cell. Sci.*, 118(Pt 14), 3117–3129.
- Weiske, J. y Huber, O. (2006). The histidine triad protein Hint1 triggers apoptosis independent of its enzymatic activity. *J. Biol. Chem.*, 281(37), 27356–27366.
- Welch, S. P. y Olson, K. G. (1991). Opiate tolerance-induced modulation of free intracellular calcium in synaptosomes. *Life Sci.*, 48(19), 1853–1861.
- Weng, Y., Batista-Schepman, P. A., Barabas, M. E., Harris, E. Q., Dinsmore, T. B., Kossyeva, E. A. y col. (2012). Prostaglandin metabolite induces inhibition of TRPA1 and channel-dependent nociception. *Mol. Pain*, 8, 75.
- Wenzel, A., Fritschy, J. M., Mohler, H. y Benke, D. (1997). NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J. Neurochem.*, 68(2), 469–478.
- Williams, J. T., Christie, M. J. y Manzoni, O. (2001). Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol. Rev.*, 81(1), 299–343.
- Winter, J., Forbes, C. A., Sternberg, J. y Lindsay, R. M. (12 de 1988). Nerve growth factor (NGF) regulates adult rat cultured dorsal root ganglion neuron responses to the excitotoxin capsaicin. *Neuron*, 1(10), 973–981.
- Wiskur, B. J., Tyler, K., Campbell-Dittmeyer, K., Chaplan, S. R., Wickenden, A. D. y Greenwood-Van Meerveld, B. (2010). A novel TRPV1 receptor antagonist JNJ-17203212 attenuates colonic hypersensitivity in rats. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 32(8), 557–564.
- Woodbury, C. J., Zwick, M., Wang, S., Lawson, J. J., Caterina, M. J., Koltzenburg, M. y col. (2004). Nociceptors lacking TRPV1 and TRPV2 have normal heat responses. *J. Neurosci.*, 24(28), 6410–6415.

- Xia, X. M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J. E. y col. (1998). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*, 395(6701), 503–507.
- Xing, H., Chen, M., Ling, J., Tan, W. y Gu, J. G. (2007). TRPM8 mechanism of cold allodynia after chronic nerve injury. *J. Neurosci.*, 27(50), 13680–13690.
- Xiong, Z. G., Raouf, R., Lu, W. Y., Wang, L. Y., Orser, B. A., Dudek, E. M. y col. (1998). Regulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by constitutively active protein kinase C. *Mol. Pharmacol.*, 54(6), 1055–1063.
- Xu, Z., Chan, H. Y., Lam, W. L., Lam, K. H., Lam, L. S., Ng, T. B., y Au, S. W. (2009). SUMO proteases: redox regulation and biological consequences. *Antioxid. Redox Signal.*, 11(6), 1453–1484.
- Xue, Y., Liu, Z., Gao, X., Jin, C., Wen, L., Yao, X. y Ren, J. (2010). GPS-SNO: computational prediction of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm. *PLoS one*, 5(6), e11290.
- Yao, J., Liu, B. y Qin, F. (2011). Modular thermal sensors in temperature-gated transient receptor potential (TRP) channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 108(27), 11109–11114.
- Yap, K. L., Kim, J., Truong, K., Sherman, M., Yuan, T. y Ikura, M. (2000). Calmodulin target database. *J. Struct. Funct. Genomics*, 1(1), 8–14.
- Yasuda, K., Raynor, K., Kong, H., Breder, C. D., Takeda, J., Reisine, T. y Bell, G. I. (1993). Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90(14), 6736–6740.
- Ye, Y., Dang, D., Zhang, J., Viet, C. T., Lam, D. K., Dolan, J. C. y col. (2011). Nerve growth factor links oral cancer progression, pain, and cachexia. *Mol. Cancer Ther.*, 10(9), 1667–1676.
- Yekkirala, A. S. (2013). Two to tango: GPCR oligomers and GPCR-TRP channel interactions in nociception. *Life Sci.*, 92(8-9), 438–445.
- Yoburn, B. C., Gomes, B. A., Rajashekara, V., Patel, C., y Patel, M. (2003). Role of G(i)alpha2-protein in opioid tolerance and mu-opioid receptor downregulation in vivo. *Synapse*, 47(2), 109–116.
- Young, T. R., & Leamey, C. A. (2009). Teneurins: important regulators of neural circuitry. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 41(5), 990–993.
- Yu, S., Xu, Z., Zou, C., Wu, D., Wang, Y., Yao, X. y col. (2014). Ion channel TRPM8 promotes hypoxic growth of prostate cancer cells via an O₂-independent and RACK1-mediated mechanism of HIF-1 α stabilization. *J. Pathol.*, 234(4), 514–525.
- Yuan, B.-Z., Jefferson, A. M., Popescu, N. C. y Reynolds, S. H. (2004). Aberrant gene expression in human non small cell lung carcinoma cells exposed to demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Neoplasia*, 6(4), 412–419.

- Yuen, E. Y., Jiang, Q., Chen, P., Feng, J. y Yan, Z. (2008). Activation of 5-HT_{2A/C} receptors counteracts 5-HT_{1A} regulation of n-methyl-D-aspartate receptor channels in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *J. Biol. Chem.*, 283(25), 17194–17204.
- Yuen, E. Y., Jiang, Q., Chen, P., Gu, Z., Feng, J. y Yan, Z. (2005). Serotonin 5-HT_{1A} receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. *J. Neurosci.*, 25(23), 5488–5501.
- Zarate, C. A. y Manji, H. K. (2009). Protein kinase C inhibitors: rationale for use and potential in the treatment of bipolar disorder. *CNS drugs*, 23(7), 569–582.
- Zhang, J., Ferguson, S. S., Barak, L. S., Bodduluri, S. R., Laporte, S. A., Law, P. Y. y Caron, M. G. (1998). Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(12), 7157–7162.
- Zhang, X., Huang, J. y McNaughton, P. A. (2005). NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J.*, 24(24), 4211–4223.
- Zhang, Y.-J., Li, H., Wu, H.-C., Shen, J., Wang, L., Yu, M.-W. y col. (2009). Silencing of Hint1, a novel tumor suppressor gene, by promoter hypermethylation in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.*, 275(2), 277–284.
- Zhao, Q., Xie, Y., Zheng, Y., Jiang, S., Liu, W., Mu, W. y col. (2014). GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic Acids Res.*, 42, W325–W330.
- Zheng, H., Chruszcz, M., Lasota, P., Lebioda, L. y Minor, W. (9 de 2008). Data mining of metal ion environments present in protein structures. *Journal of inorganic biochemistry*, 102(9), 1765–1776. doi:10.1016/j.jinorgbio.2008.05.006
- Zholos, A., Johnson, C., Burdyga, T. y Melanaphy, D. (2011). TRPM channels in the vasculature. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 704, 707–729.
- Zhu, L.-Q., Wang, S.-H., Liu, D., Yin, Y.-Y., Tian, Q., Wang, X.-C. y col. (2007). Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits long-term potentiation with synapse-associated impairments. *J. Neurosci.*, 27(45), 12211–12220.
- Zimoń, M., Baets, J., Almeida-Souza, L., De Vriendt, E., Nikodinovic, J., Parman, Y. y col. (2012). Loss-of-function mutations in HINT1 cause axonal neuropathy with neuromyotonia. *Nat. Genet.*, 44(10), 1080–1083.
- Zukin, R. S. y Bennett, M. V. (1995). Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci.*, 18(7), 306–313.
- Zurborg, S., Yurgionas, B., Jira, J. A., Caspani, O. y Heppenstall, P. A. (2007). Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat. Neurosci.*, 10(3), 277–279.
- Zygmunt, P. M. y Högestätt, E. D. (2014). TRPA1. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 222, 583–630.

Publicaciones

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Increased PKC activity and altered GSK3 β /NMDAR function drive behavior cycling in HINT1-deficient mice: bipolarity or opposing forces

Javier Garzón-Niño, María Rodríguez-Muñoz, Elsa Cortés-Montero & Pilar Sánchez-Blázquez

Received: 22 August 2016
Accepted: 25 January 2017
Published: 27 February 2017

Mice with histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) deletion exhibit manic-like symptoms that evolve into depressive-like behavior in response to stressful paradigms. Molecular and electrophysiological studies have indicated that HINT1^{-/-} mice exhibit increased PKC, PKA, and GSK3 β activities, as well as glutamate *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)/ α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic receptor (AMPA) and NR2B/NR2A subunit ratios. Pharmacological interventions stabilized their behavior but through different mechanisms. GSK3 β inhibitors and valproate directly attenuated the expression of the manic-like symptoms, whereas PKC inhibition, lamotrigine, or risperidone promoted NMDAR-mediated depressive-like behaviors that counterbalanced the preexisting manic-like symptoms. Naïve HINT1^{-/-} mice exposed to stressful paradigms rapidly manifested depressive-like behaviors in subsequent stressful situations, a capacity that persisted for a couple of weeks thereafter. During the depressive-like phase, citalopram, amitriptyline and MK801 precipitated manic-like behaviors in stressed HINT1^{-/-} mice. Notably, the antagonism of NMDARs prevented HINT1^{-/-} mice from alternating behaviors in response to stress. A comparison with “manic” Black Swiss mice indicated that in HINT1^{-/-} mice, PKC supports manic-like symptoms and reduces the expression of depressive-like behaviors via activation of GSK3 β and regulation of NR2B-enriched NMDARs. HINT1^{-/-} mice represent a suitable model for studying human BPD and may facilitate the identification of novel targets and drugs to treat this mental disorder.

Human bipolar disorder (BPD) is a chronic and debilitating illness with alternating periods of mania, *i.e.*, impulsivity, increased energy and hyperactivity, reduced anxiety, and decreased need for sleep, and depression, *i.e.*, helplessness, reduced energy and activity, and anhedonia¹. It has been proposed that manic/hypomanic episodes manifest in response to goal attainment events, circadian rhythm disruptions, spring/summer seasonal conditions, recreational stimulant use, and antidepressant medications, and that depressive episodes develop mainly because of stressful life events, general stress, fatigue, sleep deprivation, physical injury, or illness²⁻⁴.

Several currently available animal models reproduce select behavioral facets of human mania and depression and can be used to reliably detect novel drugs that may be administered for palliative treatment of these diseases. However, in the case of BPD, there is no single valid and comprehensive animal model for reproducing the fluctuating moods of affected patients⁵. To circumvent this issue, researchers have devised strategies that take advantage of the differences between mouse strains to perform coherent and comprehensive batteries of behavioral tests. Among others putative models^{1,6,7}, flinders sensitive rat lines (FSLs), which exhibit depression-like behaviors⁸, and Black Swiss (BS) mice from Taconic Farms (BStac), which exhibit manic-like behaviors⁹, are currently being utilized to study the depressive and manic aspects of BPD.

Thus, the availability of an animal exhibiting the relevant behavioral features of this complex human disease would assist in the development of new drugs for treating BPD. If molecular alterations such as those described for BPD patients were also present in this animal, the animal would be a suitable model for studying molecular aspects of human BPD. Thus, mice with a genetic deletion of histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) drew our attention as a reliable surrogate animal model of BPD. Human BPD has consistently been linked to concurrent abnormalities in protein kinase C (PKC) activity and glutamatergic transmission¹⁰⁻¹³.

Neuropharmacology, Department of Translational Neurosciences, Instituto Cajal, CSIC, Madrid E-28002, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.G.-N. (email: jgarzon@cajal.csic.es)

Enhanced PKC function¹⁴ and, to a lesser extent, enhanced PKA function¹⁵ are associated with BPD manic episodes. Elevated glutamate *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor signaling, which is commonly observed in patients suffering from depression, has also been noted in patients with bipolar depression^{16,17}. *HINT1*^{-/-} mice spontaneously exhibit increased PKC^{18,19} and PKA²⁰ activity in conjunction with abnormal NMDA receptor (NMDAR) function²⁰. The *HINT1* protein comprises 126 amino acids, weighs approximately 14 kDa, and belongs to the histidine triad (HIT) family. *HINT1* is widely expressed in the CNS²¹ and interacts with sigma 1 receptors in the cell plasma membrane to coordinate G-protein coupled receptor (GPCR) and NMDAR activity²². *HINT1* binds zinc ions to inhibit conventional PKC γ /PKC α isoenzymes and also interacts with Raf-1²³. In the absence of *HINT1*, PKC activity increases, cross-regulation between GPCRs and NMDARs diminishes, and NMDAR responsiveness to direct activation increases²⁰.

The *HINT1* gene has been related to BPD^{24,25}. *HINT1*^{-/-} mice exhibit an increased activity²⁶ and are more responsive to motor stimulation by amphetamines than *HINT1*^{+/+} wild-type (WT) mice²⁷. In the present study, we compared the behaviors and molecular features of *HINT1*^{-/-} mice with those of BStac mice, an animal model for manic-like behaviors, and compared the responses of these parameters to a series of pharmacological interventions. *HINT1*^{-/-} and BStac mice displayed manic-like behaviors that remitted in response to mood stabilizers but were insensitive to drugs with antidepressant activity in humans. In *HINT1*^{-/-} mice, but not in BStac mice, emotional stress precipitated antidepressant-sensitive states that could also be managed with NMDAR blockers. PKC inhibition reduced manic-like symptoms in *HINT1*^{-/-} mice but exerted only limited effects in *HINT1*^{+/+} WT and BStac mice. Therefore, *HINT1*^{-/-} mice exhibit certain behavioral and molecular features of human BPD, and PKC and NMDARs contribute to the expression of this abnormal phenotype.

Results

Characterization of *HINT1*^{-/-} mice. We tested *HINT1*^{-/-} mice and their *HINT1*^{+/+} WT littermates in a battery of experimental paradigms representing specific behavioral domains of human mania. This battery included spontaneous activity test, sweet solution preference test, resident-intruder test, tail suspension test (TST), forced swim test (FST) and amphetamine-induced hyperactivity test. *HINT1*^{-/-} mice remained in the open area of the observation field for longer periods than their counterparts and also exhibited higher motor sensitivity to psychostimulants, higher aggression levels in the resident/intruder test and a greater preference for sweetened solutions than *HINT1*^{+/+} WT mice. Moreover, *HINT1*^{-/-} mice displayed higher activity levels than *HINT1*^{+/+} WT mice during stressful situations, such as the TST or FST (Fig. 1A–F), and PKC and PKA activity levels were higher in *HINT1*^{-/-} mice than in *HINT1*^{+/+} WT mice. Accordingly, *HINT1*^{-/-} mice exhibited increased serine phosphorylation of the PKC substrate neuromodulin (GAP43) (Fig. 1G). Mood stabilizers, such as valproate, and PKC inhibitors (iPKCs) diminished *HINT1*^{-/-} mice activity levels in the FST and TST, lessened their preference for sweet solutions and weakened the effects of psychostimulant on their activity levels (Fig. 1H and Supp. Fig. 1).

Therefore, the behavior of *HINT1*^{-/-} mice differs from that of *HINT1*^{+/+} WT mice, as the former exhibits typical manic-like behavior features²⁸. We then compared the behavior of *HINT1*^{-/-} mice with that of BStac mice, an animal model for human mania that also exhibits increased PKC activity levels (Fig. 1G). In the activity cage, BStac mice exhibited a horizontal activity level greater than that of *HINT1*^{-/-} and *HINT1*^{+/+} WT mice. Amphetamine elicited significant increases in locomotor activity in *HINT1*^{-/-} and BStac mice but had less of an effect on *HINT1*^{+/+} WT mice. It is known that inhibition of GSK3 or of PKC reduces amphetamine-evoked hyperactivity in “manic” BStac mice^{29,30}. In our assays, inhibition of GSK3 β (TDZD8) or PKC (Gö7874) did not attenuate the effects of amphetamine on *HINT1*^{+/+} WT mice but did reduce the effects of amphetamine on BStac and *HINT1*^{-/-} mice. PKC inhibition was particularly effective in minimizing the effects of amphetamine on *HINT1*^{-/-} mice (Fig. 2A). Taken together, these data suggest that targeted *HINT1* gene deletion facilitates the expression of manic-like behaviors.

We then evaluated the presence and regulatory phosphorylations of GSK3 β , an enzyme that exhibits alterations in most mood disorders. We included Black Swiss mice from Charles River (BScr) for some parts of the study as a putative control of BStac mice. Although BScr share a genetic background with BStac mice, they do not exhibit the manic-like behavioral phenotype³¹. The molecular exploration showed that total GSK3 β levels in the frontal cortex were not significantly different among the four groups of mice. However, phosphorylation analysis revealed marked differences in the regulation of GSK3 β . Using *HINT1*^{+/+} WT mice data as a reference, we observed that Akt-mediated inhibitory phosphorylation of GSK3 β at serine 9 (P-S9)³² decreased in *HINT1*^{-/-} mice but increased in BScr mice. Regarding the activating phosphorylation of GSK3 β at tyrosine 216 (Y216)³³, BStac mice exhibited higher P-Y216 GSK3 β levels than did *HINT1*^{+/+} WT mice and BScr mice (Fig. 2B). Manic-like behavior is usually associated with high GSK3 β activity and ceases abruptly after GSK3 β pharmacological inhibition³⁴. BStac and *HINT1*^{-/-} mice exhibited manic-like behaviors but also showed differences in their cortical levels of the phosphorylated and non-phosphorylated forms of GSK3 β . As the activating P-Y216 predominated over the inhibitory P-S9 in both groups of mice, their resulting GSK3 β activity could be higher than in *HINT1*^{+/+} WT mice.

Consistent with their manic-like profile, *HINT1*^{-/-} mice exhibited greater swim activity and, consequently, shorter immobility periods during the FST than did *HINT1*^{+/+} WT mice. We then investigated in these mice the effects of pharmacological interventions that are effective in treating human mania and depression. Citalopram, amitriptyline, and bupropion did not produce behavior changes in *HINT1*^{-/-} mice but did increase the activity levels of *HINT1*^{+/+} WT mice such that their periods of inactivity were similar to those exhibited by *HINT1*^{-/-} mice. The NMDAR antagonist MK801 increased the struggling and swim activity levels of *HINT1*^{+/+} WT mice while slightly augmenting the more animated behaviors of *HINT1*^{-/-} mice during the FST (Fig. 3A). iPKCs, such as Gö7874 and chelerythrine, did not significantly alter the activity levels of *HINT1*^{+/+} WT mice at the doses used in this study. However, these drugs reduced the swim activity exhibited by *HINT1*^{-/-} mice to the levels observed

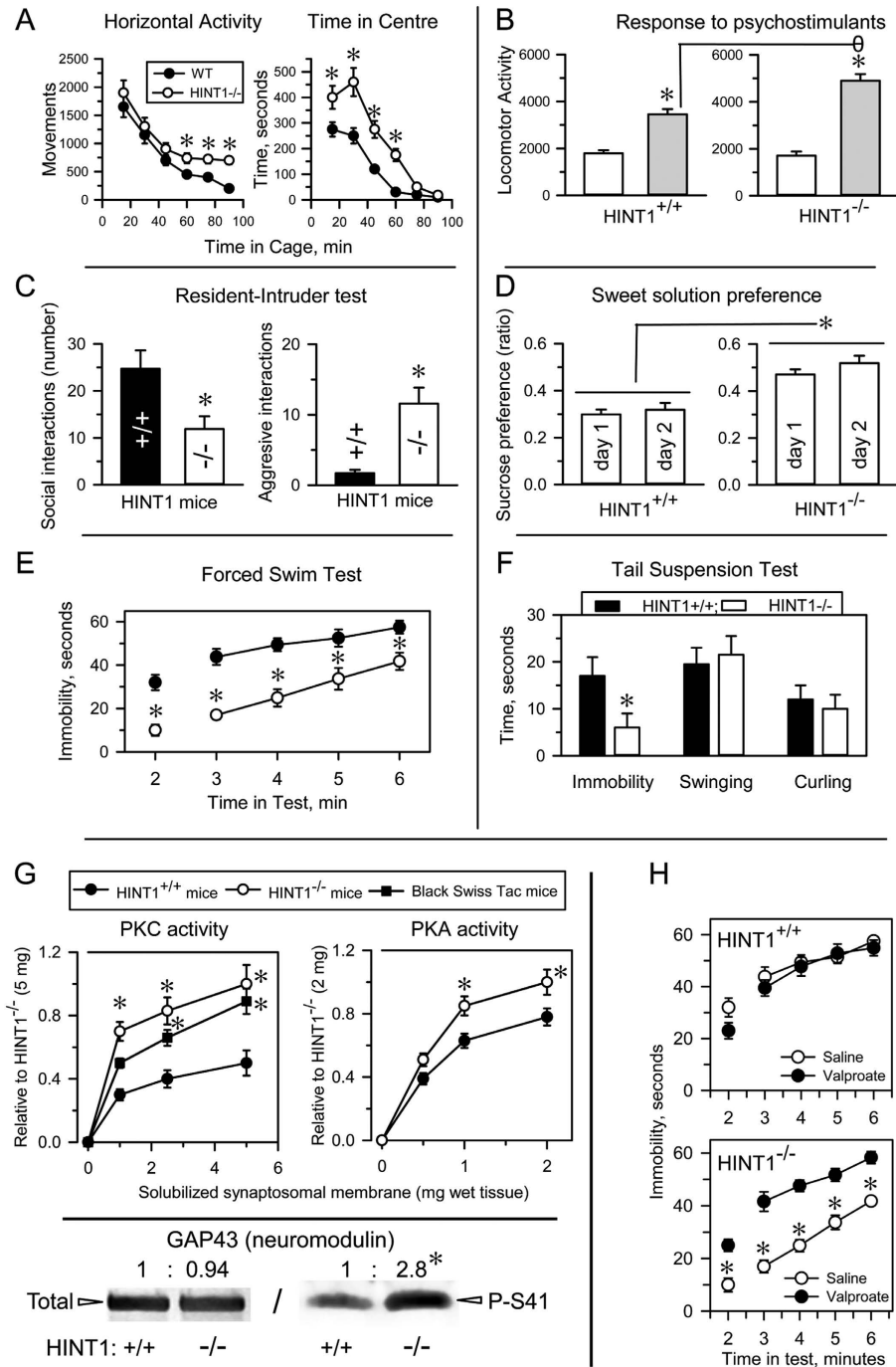


Figure 1. HINT1^{-/-} mice exhibit manic-like behaviors. (A) Locomotor habituation and time on center (risk taking behavior) exhibited by HINT1^{+/+} WT and HINT1^{-/-} male mice; (B) response to acute systemic saline and apomorphine (5 mg/kg, ip) administration (hypersensitivity to psychostimulants); (C) social and aggressive interactions; (D) sweet solution preference ratios (hedonistic drive) on days 1 and 2 of the test; (E,F) immobility time (goal-directed activity) in the forced swim test (FST) and tail suspension test (TST). Each assay was performed on different cohorts of mice. The results are expressed as the mean \pm SEM of total scores (n = 12–15/group). (G) PKC and PKA enzymatic activity in frontal cortices from HINT1^{+/+} WT, HINT1^{-/-}, and BStac mice. *Significantly different from the HINT1^{+/+} group; ANOVA, all pairwise Holm-Sidak multiple comparison tests, $p < 0.05$. Lower panel: PKC substrate GAP43 and its phosphorylation at serine41 (P-S41) in frontal cortices obtained from HINT1^{+/+} WT and HINT1^{-/-} mice. Immunoblots (average optical density of the pixels within the object area/mm², Quantity One Software, Bio-Rad, Madrid, Spain) were expressed as changes relative to the HINT1^{+/+} WT group (assigned an arbitrary value of 1). The assay was repeated three times, and tubulin was used as a loading control. *Significantly different from HINT1^{+/+} WT, paired t test, $p < 0.05$. (H) Treatment with the mood stabilizer valproate (200 mg/kg, ip) augmented the immobility scores of HINT1^{-/-} mice during the FST without affecting the performances of HINT1^{+/+} WT mice. *Significantly different from the saline-treated group; ANOVA, all pairwise Holm-Sidak multiple comparison tests, $p < 0.05$. Ip (intraperitoneal).

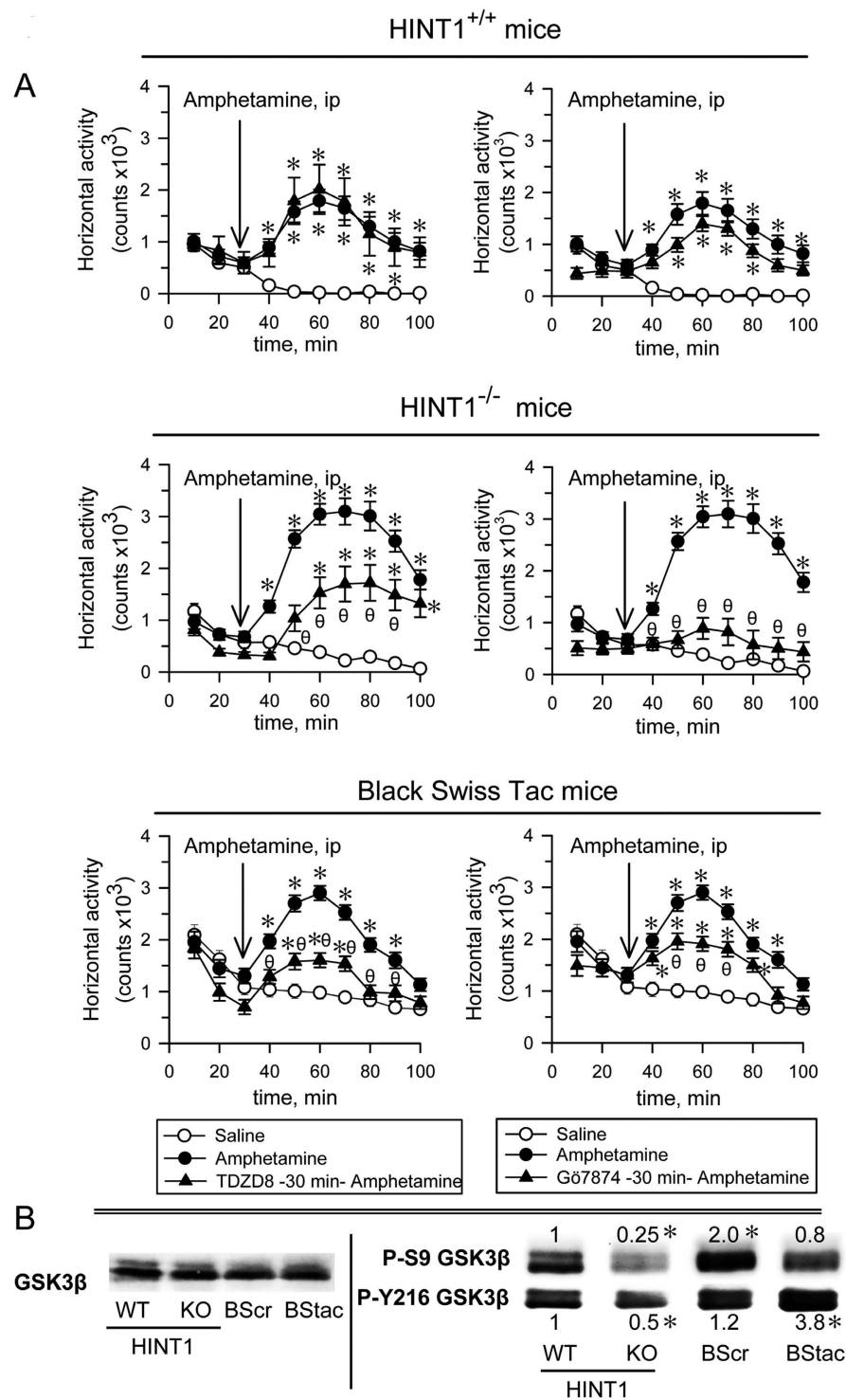


Figure 2. The influence of PKC and GSK3 β inhibitors on the hyperactivity evoked by amphetamine in HINT1^{+/+} WT, HINT1^{-/-} and BStac mice. (A) Horizontal activity of HINT1^{+/+} WT HINT1^{-/-}, and BStac mice pre-treated (at time 0) with vehicle (saline), TDZD8 (20 nmol, icv), or Gö7874 (1 nmol, icv). After 30 min of activity, the mice received saline or amphetamine (2 mg/kg, ip) and were observed during the subsequent 70 min period. Each point is the computed mean \pm SEM of the groups. *Significantly different from the control group, which received vehicle instead of amphetamine; θ significantly different from the group that received amphetamine and vehicle instead of the kinase inhibitor. ANOVA, Dunnett multiple comparisons vs control group, $p < 0.05$. (B) Total and phosphorylated GSK3 β in the synaptosomes of frontal cortices obtained from HINT1^{+/+} WT, HINT1^{-/-} KO, BScr, and BStac mice. Within each row, the P-S9 and Y216 values of the KO, BScr and BStac mice were compared to those of the WT mice (assigned an arbitrary value of 1). *Significantly different from the control group, ANOVA, Dunnett multiple comparisons vs control group, $p < 0.05$. Representative blots are shown (details, see Figure 1). Icv (intracerebroventricular).

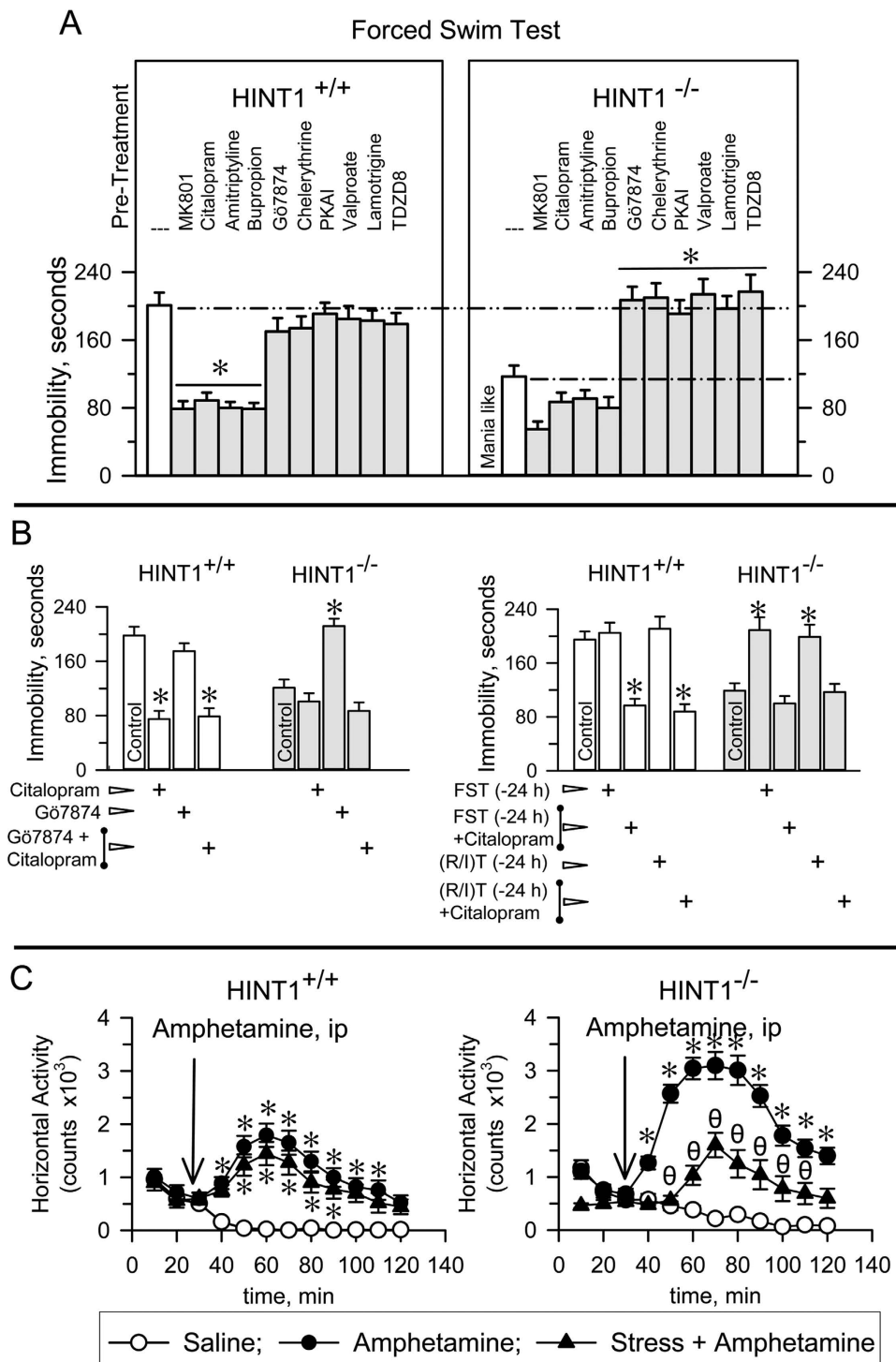


Figure 3. Swim activity of $HINT1^{+/+}$ WT and $HINT1^{-/-}$ mice during the FST: effects of stress, PKC and GSK3 β inhibitors, antidepressants, and mood-stabilizers. (A) Compounds were acutely administered either systemically ip (citalopram, 10 mg/kg; amitriptyline, 5 mg/kg; bupropion, 10 mg/kg; valproate, 200 mg/kg; lamotrigine, 30 mg/kg; 60 min prior the FST) or icv (MK801, 1 nmol; G δ 7874, 1 nmol; chelerythrine, 2 nmol; PKAi, 5 nmol; TDZD8, 20 nmol; 30 min prior the test). These doses did not significantly affect spontaneous mouse activity. (B) Effects of citalopram, PKC inhibition, FST exposure or resident intruder test (R/I) exposure on the immobility periods of $HINT1^{-/-}$ (pro-depressive behavior) and $HINT1^{+/+}$ WT mice during the FST. (A,B) The results are expressed as the mean \pm SEM of the total scores ($n = 8$ /group). *Indicate significant differences from the group treated with saline. ANOVA, Dunnett multiple comparisons vs control group, $p < 0.05$. (C) Effect of pre-exposure to acute stress on the motor-activating effects of the psychostimulant amphetamine in $HINT1^{+/+}$ WT and $HINT1^{-/-}$ mice. Each point is the computed mean \pm SEM. *Significantly different from the control (saline) group ($n = 8$ per group); θ significantly different from the naïve group that received amphetamine. See Fig. 2A.

for HINT1^{+/+} WT mice. PKA inhibitors, lamotrigine, valproate and GSK3 β inhibitors did not affect the swim behaviors of HINT1^{+/+} WT mice; however, these drugs also mitigated the manic-like behaviors of HINT1^{-/-} mice. Interestingly, G δ 7874 did not alter the activating effects of citalopram in HINT1^{+/+} WT mice; however, citalopram inhibited the effects of PKC inhibition in HINT1^{-/-} mice and thus preserved their manic-like behavior (Fig. 3B, left panel).

During the FST, development of depressive-like behaviors reduced the swim activity of HINT1^{+/+} WT mice, but this effect was less evident in HINT1^{-/-} mice. A second exposure of the mice to the stressful FST 24 h later did not significantly alter the activity of HINT1^{+/+} WT mice, but reduced the swim activity of HINT1^{-/-} mice (Fig. 3B, right panel). HINT1^{-/-} mice exhibited significantly better learning than wild type HINT1^{+/+} mice during passive avoidance testing and also exhibited signs of elevated neurogenesis compared with their counterparts (Supp. Fig. 2A,B). We thus considered the possibility that the abovementioned changes in their swim behavior may have been the result of learned behavior. However, it is worth noting that the activity levels of HINT1^{-/-} mice also decreased in the FST when these mice had previously been exposed to another form of stress, such as the resident-intruder test. Furthermore, when evaluated in the activity cage, HINT1^{-/-} and BStac mice exhibited higher activity than HINT1^{+/+} WT mice. As observed for the FST, the activity of HINT1^{-/-} mice in the activity cage subsequently diminished on day two and was comparable with that of HINT1^{+/+} WT mice, probably as a result of previous testing, while the activity levels of BStac mice remained elevated (Supp. Fig. 2C). Notably, citalopram restored manic-like symptoms in stress-primed HINT1^{-/-} mice (Fig. 3B right panel). Acute stress attenuated the activating effects of amphetamine in HINT1^{-/-} mice, but not in HINT1^{+/+} WT mice (Fig. 3C). In contrast to HINT1^{-/-} mice, BStac mice exhibited persistent manic-like behaviors after exposure to multiple forms of stress.

Stress promotes depressive-like behaviors in HINT1^{-/-} mice. HINT1^{-/-} mice exhibited manic-like behaviors and greater swim activity in the FST than HINT1^{+/+} WT mice. Although the activity level of BStac mice was higher than that of HINT1^{+/+} WT mice, both groups may be considered control animals for BStac and HINT1^{-/-} mice respectively. First, BScr or HINT1^{+/+} WT mice did not exhibit significant behavior changes following exposure to acute stress or treatment with GSK3 β inhibitors, mood stabilizers, lamotrigine, or risperidone. Second, the aforementioned pharmacological treatments increased swim immobility in HINT1^{-/-} mice to the levels of HINT1^{+/+} WT mice, and in BStac mice to the levels seen in BScr mice (Fig. 4).

In HINT1^{+/+} WT mice that had received saline or iPKCs, administration of MK801 or citalopram exerted similar stimulatory effects on their swim behavior. However, MK801/citalopram did not produce such stimulation when HINT1^{+/+} WT mice received TDZD8, valproate, or lamotrigine. MK801 was effective counteracting the effects of iPKCs, lamotrigine, or 3F8 on the swim activity of HINT1^{-/-} mice. However, MK801 was much less effective inhibiting the effects of valproate or other GSK3 β inhibitors, such as TDZD8 and TGC24, in these mice. Thus, the expression of stress-evoked depressive-like episodes requires NMDAR activity, and NMDAR inhibition, citalopram and certain GSK3 β inhibitors diminish the manifestation of these behaviors.

Regarding HINT1^{-/-} and BStac mice, with the exception of iPKCs, interventions that reduced the swim activity of HINT1^{-/-} mice, such as TDZD8 and valproate, significantly increased the immobility of BStac mice during the FST. While MK801 and citalopram failed to enhance the swim activity of BStac mice, MK801 reduced the effects of TDZD8 and valproate in these “manic” mice. It seems that NMDAR-dependent processes cannot prevail over processes triggering manic-like behavior in BStac mice. In these mice, inhibition of GSK3 β , but not acute stress, attenuated the expression of pro-manic mechanisms to the level that permitted the expression of depressive-like behaviors (Fig. 4). The behavior of acutely stressed HINT1^{-/-} mice was similar to that of HINT1^{+/+} WT mice for several days. However, over time, stressed HINT1^{-/-} mice gradually began to exhibit their previous manic-like behaviors, such as increases in their swim activity (Fig. 5A). In contrast, the effects of PKC or GSK3 β inhibition on the swim activity of stressed HINT1^{-/-} mice persisted for only 2 or 3 days (Fig. 5A,B). Remarkably, antidepressants did not modify the swim activity of naïve HINT1^{-/-} mice; however, these drugs rescued the manic-like swim activity of stressed HINT1^{-/-} mice exhibiting depressive-like behaviors (Fig. 5C). The NMDAR antagonist MK801 also increased the activity levels of stressed HINT1^{-/-} mice but to the extent that activity levels were similar to those exhibited by “manic” BStac mice (Fig. 5B). Notably, a single administration of the NMDAR antagonist prior to the first FST prevented stress from promoting depressive-like behaviors during the days that followed (Fig. 5A).

HINT1^{-/-} mice exhibit increased PKC activity and altered glutamate NMDA receptors. HINT1^{-/-} mice share a series of therapeutically relevant alterations with BPD patients, such as increased PKC, PKA and GSK3 β activity levels and altered glutamate NMDAR composition and function. Although the levels of NMDAR NR1 subunit were similar in cortical synaptosomes of HINT1^{-/-} and HINT1^{+/+} WT mice, the levels of the NR1 subtype that carries the C1 cytosolic segment were two-fold higher in HINT1^{-/-} mice. NR2A subunit levels were comparable in these two groups of mice, but NR2B subunit levels increased in HINT1^{-/-} mice. Notably, BStac and BScr mice exhibited no differences in NMDAR subunit levels (Fig. 6A).

The possible influence of NR2B-enriched NMDARs on synaptic function was then addressed. The electrophysiological analysis indicated that synaptic properties were apparently similar in HINT1^{-/-} and HINT1^{+/+} WT neurons. Thus, stimulation-evoked excitatory postsynaptic currents (EPSCs) did not significantly differ between these neurons. However, whole-cell recording from CA1 pyramidal neurons detected NMDAR-mediated slow inward currents of higher amplitude in HINT1^{-/-} neurons. Moreover, the NMDAR/AMPA ratio of the EPSCs increased in HINT1^{-/-} neurons, and interestingly, as a consequence of PKC inhibition, paired pulse facilitation increased in HINT1^{-/-} mice, but not in HINT1^{+/+} WT mice, suggesting an enhanced neurotransmitter release in HINT1^{-/-} mice (Supp. Fig. 3). Neural facilitation refers to a condition whereby postsynaptic potentials increase when a stimulatory impulse closely follows a previous and identical impulse. This paired pulse facilitation is a

Forced Swim Test

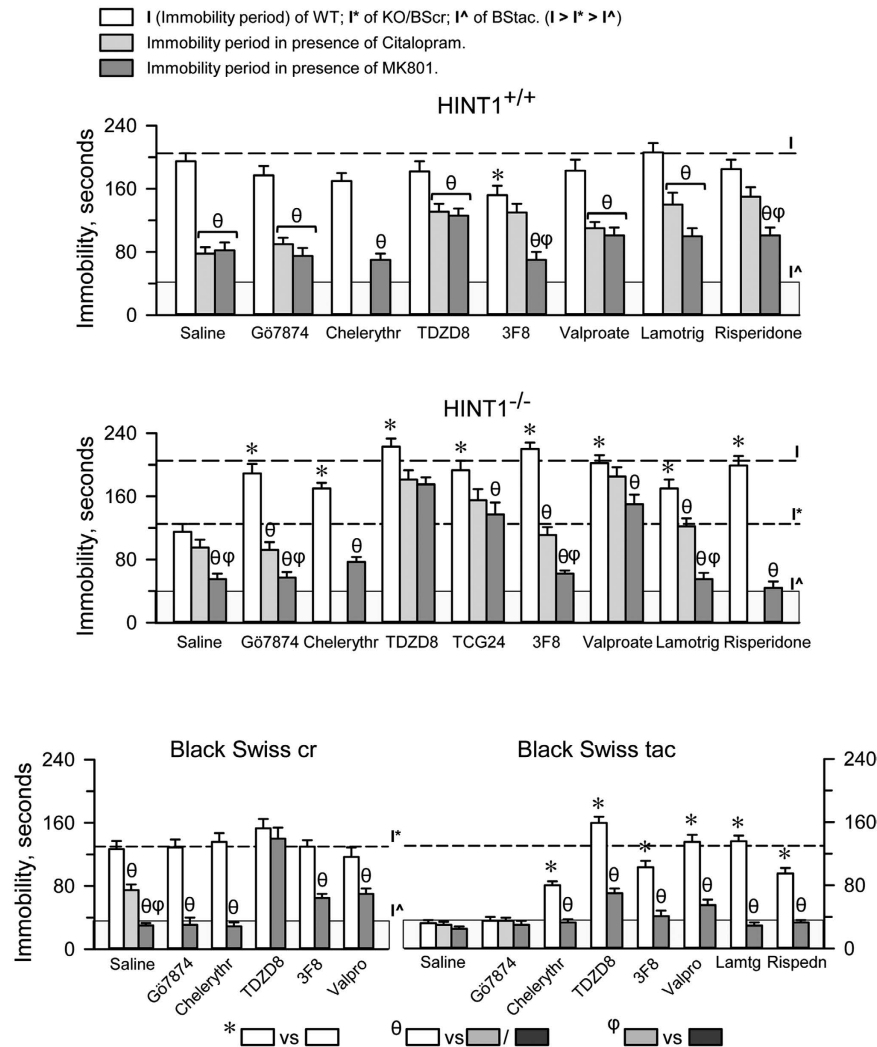


Figure 4. NMDAR antagonism abolishes depressive-like behaviors and unmarks anti-manic effects promoted by pharmacological treatments in mice during the FST. The effects of PKC inhibition, GSK3 β inhibitors, and different mood stabilizers were studied in HINT1^{+/+} WT, HINT1^{-/-}, BScr, and BStac mice treated with vehicle, MK801 (1 nmol, icv), or citalopram (10 mg/kg, ip). The compounds were administered as indicated in Fig. 3. Risperidone (7 nmol, icv) and 3F8 (1 nmol, icv) were injected 30 min prior to the FST. The doses of MK801 and citalopram used in this study produced comparable effects on the swim activity of HINT1^{+/+} WT mice. Each bar represents the mean \pm SEM of the data obtained from 10 mice. The balance between activity-stimulating behaviors and pro-depressive behaviors determined the swim vigor exhibited by the animals during the FST. Lower immobility scores (I) implied higher mice vigor (swim activity). For each strain of mice, * indicates a significant difference from the control group, which received saline instead of treatment (open bars), θ indicates that the activity of the mice significantly increased after receiving MK801/citalopram (gray bars), and ϕ indicates that the effects of MK801 on the corresponding treatment are different from those of citalopram. ANOVA, Dunnett multiple comparisons vs control group, $p < 0.05$.

form of short-term synaptic plasticity mediated exclusively by pre-synaptic neurotransmitter release. Therefore, in HINT1^{-/-} mice an apparent synaptic normality covers a series of molecular and physiological abnormalities, such as the abovementioned increases in PKC activity, altered NMDAR vs AMPAR function and an increased NR2B/NR2A subunit ratio.

Oscillations in the functional state of cortical synapses are essential for processes such as learning, memory consolidation and storage. Relevant to our study, the adequate transition from long-term potentiation (LTP) to long-term depression (LTD), and vice versa, requires the coordinated activities of GSK3 β and NMDARs. Alterations in their function elicit a series of synaptopathies that are associated with different neural disorders, including BPD. The ratio of P-Y216 to P-S9 was higher in HINT1^{-/-} mice than in HINT1^{+/+} WT mice (Figs 2B and 5C). Citalopram enhanced P-S9 and P-Y216 GSK3 β levels in HINT1^{+/+} WT mice but surprisingly failed to do so in HINT1^{-/-} mice. Exposure of the latter mice to emotional stress resulted in increased GSK3 β

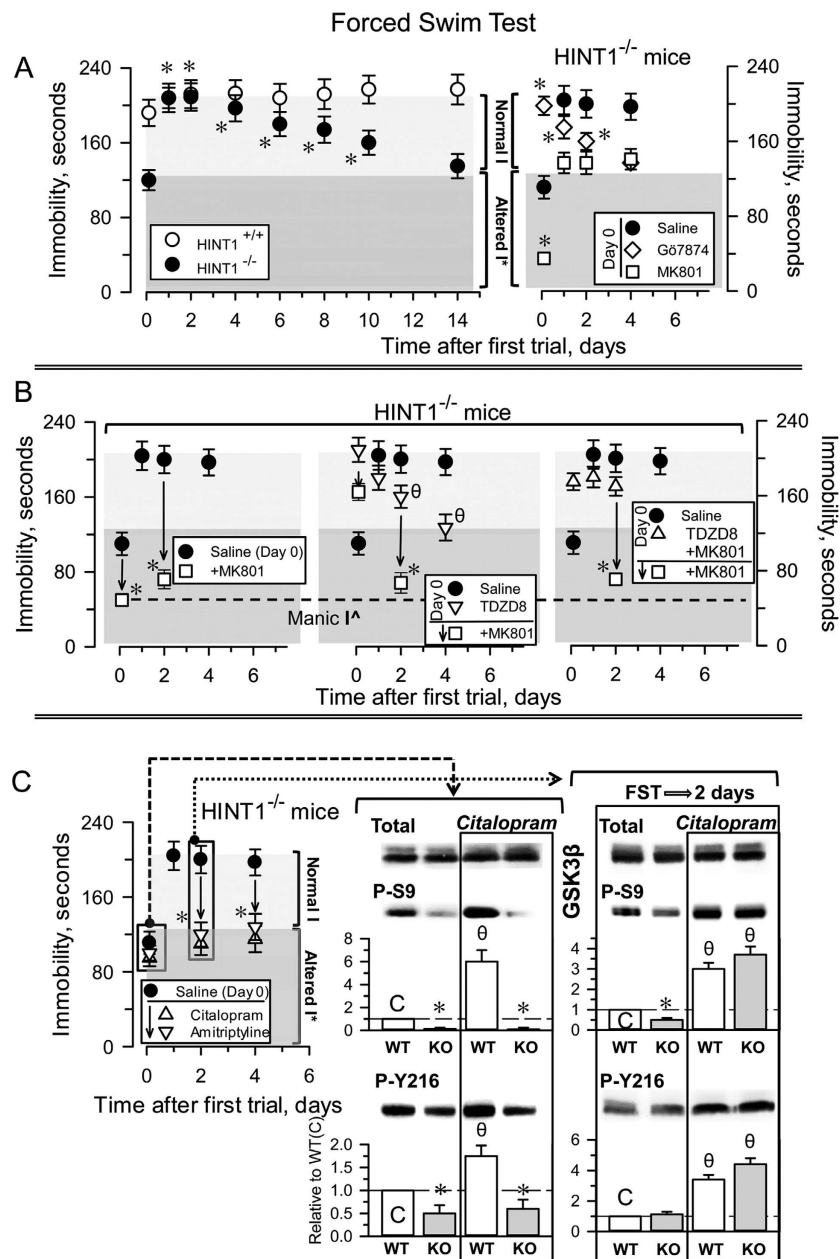


Figure 5. Behavioral and molecular changes induced by stress in HINT1^{+/+} WT and HINT1^{-/-} mice.

(A) Left panel: Untreated mice were subjected to the FST at day 0 and were divided into groups of six. At each indicated time interval, a different group was re-evaluated. The immobility periods of HINT1^{+/+} WT (Normal I) and HINT1^{-/-} mice (Altered I*) during the first FST are indicated. Right panel: effects of MK801 and G67874 on the behavior exhibited by stress-primed HINT1^{-/-} mice. The results are the mean \pm SEM of total scores ($n = 6$ /group). *Significant difference from the immobility (I*) displayed by HINT1^{-/-} control mice on the initial FST (day 0). (B) Effects of MK801 and TDZD8 on the depressive-like behaviors exhibited by stressed HINT1^{-/-} mice. On day 0, the mice received the treatment indicated before the first FST. In the middle panel, θ indicates that after two days, swim activity of HINT1^{-/-} mice receiving saline was significantly lower than that of those receiving TDZD8. *MK801 given at the days specified by the arrows significantly increased mice swim activity during the second FST. The data are the mean \pm SEM of total scores ($n = 6$ /group). (C) Left panel: citalopram/amitriptyline administration reduced the immobility of stressed but not naïve HINT1^{-/-} mice ($n = 6$). *Significant difference from saline-treated HINT1^{-/-} mice at the indicated time after the first FST. Middle and right panels: effect of citalopram on GSK3 β content and regulatory phosphorylation, P-S9 and p-Y216, in frontal cortices of HINT1^{+/+} WT and HINT1^{-/-} KO mice. Mice receiving saline or citalopram were immediately euthanized after the first FST (day 0) or after the second FST, which was performed 48 h after the first. Each bar represents the mean \pm SEM of data from at least three determinations using different gels and blots. An arbitrary value of 1 was assigned to the control HINT1^{+/+} WT mice data (C). *Significant difference between the KO (gray bars) and the WT group (open bars); θ indicates significant differences caused by citalopram but within each group of mice, WT and KO. All comparisons: ANOVA, Dunnett multiple comparisons vs control group, $p < 0.05$.

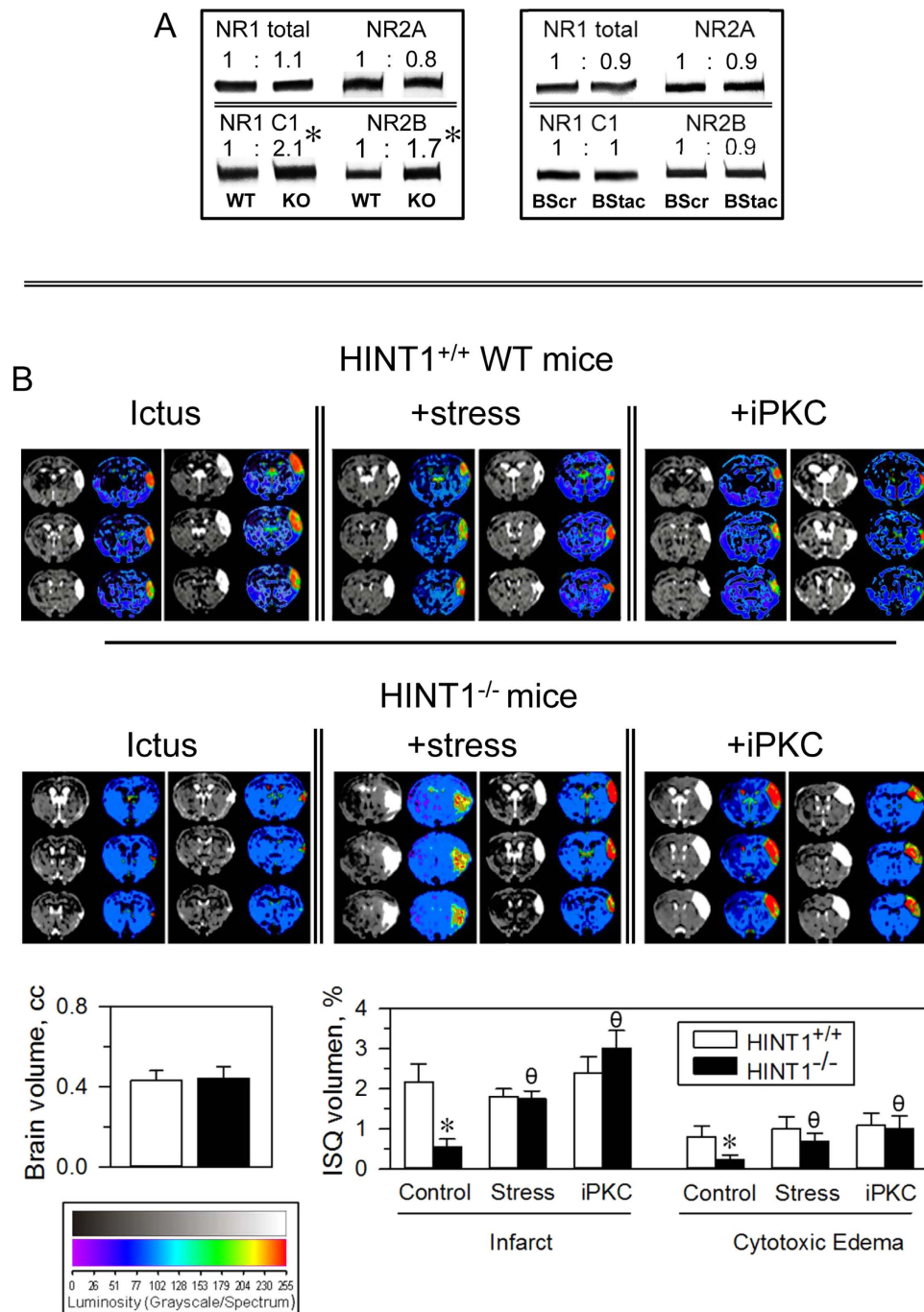


Figure 6. (A) NMDAR NR subunits in frontal cortices of HINT1^{+/+} (WT), HINT1^{-/-} (KO), BScr, and BStac mice. Within each row, the values of KO were referred to that of WT mice (assigned an arbitrary value of 1). Equal for BStac vs BScr mice. *Significantly different from the control group, ANOVA, Dunnett multiple comparisons vs control group, $p < 0.05$. Representative blots are shown (details, see Fig. 1). (B) Effect of PKC inhibition and stress on ischemic brain damage elicited in HINT1^{-/-} mice. Representative brain section images from HINT1^{+/+} WT and HINT1^{-/-} mice obtained 48 h after pMCAO (BIOSPEC BMT 47/40 (Bruker, Ettlingen, Germany)). Mice were stressed (FST) or treated with G δ 7874 (1nmol, iPKC) prior to surgery. The dorsal third ventricle was used as an internal anatomical marker in HINT1^{+/+} WT and HINT1^{-/-} mice to align, register, and compare the image collections from each mouse. The infarct volume was calculated as the percentage of the hemisphere that was infarcted (ImageJ 1.44j software, NIH, Bethesda, MD, USA). The groups comprised eight mice, and the data are represented as the mean \pm SEM. The bar graphs indicate the edema and infarct volumes (mean \pm SEM) of the HINT1^{+/+} WT (white bars) and HINT1^{-/-} (black bars) mice. *Significantly different from the paired HINT1^{+/+} WT group; ϕ significantly different from the HINT1^{-/-} control group; paired t test, $p < 0.05$.

phosphorylation. In these circumstances, citalopram altered the levels of GSK3 β regulatory phosphorylations in HINT1^{-/-} mice (Fig. 5C). The NMDAR blocker MK801 was more effective than citalopram in increasing swim activity and GSK3 β phosphorylation levels in HINT1^{-/-} mice (Supp. Fig. 4).

PKC activity increases in BPD patients and thus, the study of this kinase in this illness has gained relevance in recent years^{35,36}. HINT1^{-/-} mice exhibit high PKC activity levels but also increased NMDAR responses to their direct activators^{19,20}. Thus, suggesting an adaptive response of NMDARs to prevent glutamate hypofunction in these mice. Inhibition of PKC in these mice increased their mobility, via MK801-sensitive behaviors. Because the HINT1 protein negatively regulates PKC and NMDAR activity^{20,37}, the possibility exists that PKC restrains NMDAR activity in HINT1^{-/-} mice. We addressed this issue using the excitotoxic neurological damage produced by stroke, which is mostly mediated by NMDAR overactivation³⁸. HINT1^{-/-} mice subjected to unilateral permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO) exhibit much less severe infarction and edema than are seen in HINT1^{+/+} WT mice²². We could observe that PKC inhibition prior to surgery did not affect stroke-induced neurological damage severity in HINT1^{+/+} WT mice; however, this intervention greatly enhanced stroke-induced brain damage in HINT1^{-/-} mice (Fig. 6B). Because acute stress and PKC inhibition exerted comparable effects on the swim behavior of HINT1^{-/-} mice, we also evaluated the influence of stress in this animal model of glutamate-mediated ischemic damage. Previous exposure of mice to the FST brought about increases in stroke-induced neural damage in HINT1^{-/-} mice but did not augment its severity in HINT1^{+/+} WT mice (Fig. 6B). Similar to the electrophysiological study, the stroke assay also suggested that PKC negatively regulates NMDARs in HINT1^{-/-} mice and that PKC inhibition or acute stress removes this control.

PKC regulates the Akt/GSK3 β signaling pathway in HINT1^{-/-} mice. Alterations in the Akt/GSK3 β signaling pathway have been associated with mood disorders and schizophrenia. Both proteins display kinase activity, and Akt reduces GSK3 β activity by phosphorylating S9. HINT1^{-/-} mice show little phosphorylation at this GSK3 β residue (Fig. 2B), and decreases in the levels of P-S9 GSK3 β are correlated with the predominance of mania/hypomania in BPD patients³⁴. Total Akt levels were comparable between HINT1^{+/+} WT mice and HINT1^{-/-} mice; however, the phosphorylations that activate Akt, S473 and T308, were present at much lower levels in HINT1^{-/-} mice. In this signaling pathway, protein phosphatase 1 (PP1) removes the abovementioned Akt and GSK3 β phosphorylations. The activity of PP1 is negatively regulated by binding to the phosphorylated form of the inhibitor I1 and to the non-phosphorylated form of the inhibitor I2. Thus, Akt and GSK3 β phosphorylation levels suggest that PP1 activity increased in HINT1^{-/-} mice. Whereas PP1, I1 and I2 levels were comparable in WT and KO mice, in KO mice the phosphorylation of inhibitor I2 was augmented, which may indeed promote PP1 activity (Fig. 7). The I2 is a substrate of GSK3 β , and its increased phosphorylation correlates with the apparent higher activity of this kinase in HINT1^{-/-} mice. PKC and the calcium and calmodulin-regulated phosphatase calcineurin can also promote PP1 activity. PKC diminishes PKA-mediated phosphorylation of I1, and calcineurin removes this phosphorylation from I1. In HINT1^{-/-} mice P-I1/PP1 inhibitory complexes did not significantly differ from those observed in HINT1^{+/+} WT mice. PKC activates Cabin/Cain³⁹, an inhibitor of calmodulin and in HINT1^{-/-} mice the activity of calcineurin diminished (Fig. 8A). Thus, the outcome of an increased PKC activity could compensate calcineurin negative effects on the levels of P-I1. β -catenin, another relevant signaling protein downstream of the Akt/GSK3 β pathway, also influences the pathophysiology of neural disorders. In HINT1^{-/-} mice, the GSK3 β -mediated phosphorylation of β -catenin that promotes its destruction increased, and β -catenin total levels were subsequently diminished (Fig. 7).

PKC negatively regulates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway⁴⁰. Hence, we analyzed whether molecular changes exhibited by HINT1^{-/-} mice were due to increased PKC function. The inhibition of PKC did not alter the content of Akt, GSK3 β , PP1, I1 or I2 in HINT1^{+/+} WT and HINT1^{-/-} mice. However, iPKC increased total levels of β -catenin in HINT1-deficient mice. PKC inhibition caused significant changes in the phosphorylation levels of the signaling proteins studied; P-S473 and P-T308 Akt were moderately augmented in HINT1^{+/+} WT mice and greatly increased in HINT1^{-/-} mice. In HINT1^{+/+} WT mice, iPKC did not alter GSK3 β regulatory phosphorylation levels. In contrast, in HINT1^{-/-} mice, the activating P-Y216 GSK3 β was augmented 3-fold and the inhibitory P-S9 GSK3 β (Akt site) increased by 22-fold. A similar outcome was obtained for the inhibitory complex P-I1/PP1, which increased approximately 10-fold in HINT1^{-/-} mice, confirming the relevance of PKC as a brake for P-I1 formation in this signaling pathway. In accordance with the effect of iPKC on GSK3 β phosphorylation, in HINT1^{-/-} mice, β -catenin exhibited reductions in P-S33/37 and P-T41 (GSK3 β sites) and β -catenin total levels augmented. These results suggest an essential role for PKC in the molecular alterations observed in HINT1-deficient mice.

HINT1^{-/-} mice and HINT1^{+/+} WT mice responded differently to emotional stress paradigms, and these differences affected various biochemical parameters (Fig. 8). PKC activity negatively regulates calcineurin phosphatase activity; indeed, iPKC enhanced its effects in HINT1 KO and WT mice. Moreover, a few min after FST or resident/intruder tests, calcineurin activity increased in HINT1^{-/-} mice (Fig. 8A). After 6 min of the FST, P-S473 Akt levels increased in HINT1^{+/+} WT mice, but only slightly in HINT1^{-/-} mice. Equally, after this brief interval post-FST, P-S9 and Y216 GSK3 β levels did not significantly change in either group. However, after 24/48 h, HINT1^{-/-} mice exhibited significant increases in GSK3 β phosphorylation at both positions, approaching the levels observed in HINT1^{+/+} WT mice (Fig. 5C). Thus, in HINT1^{-/-} mice, the inhibition of PKC prior to the FST challenge precipitated changes in Akt/GSK3 β phosphorylation levels similar to those observed when FST trials were spaced 24/48 h apart (Fig. 8B).

Discussion

A suitable animal model of human BPD must exhibit molecular and behavioral alterations similar to those reported in BPD patients, and, most importantly, pharmacological interventions should stabilize the behavior of affected individuals without altering that of healthy individuals. The present study addressed these essential

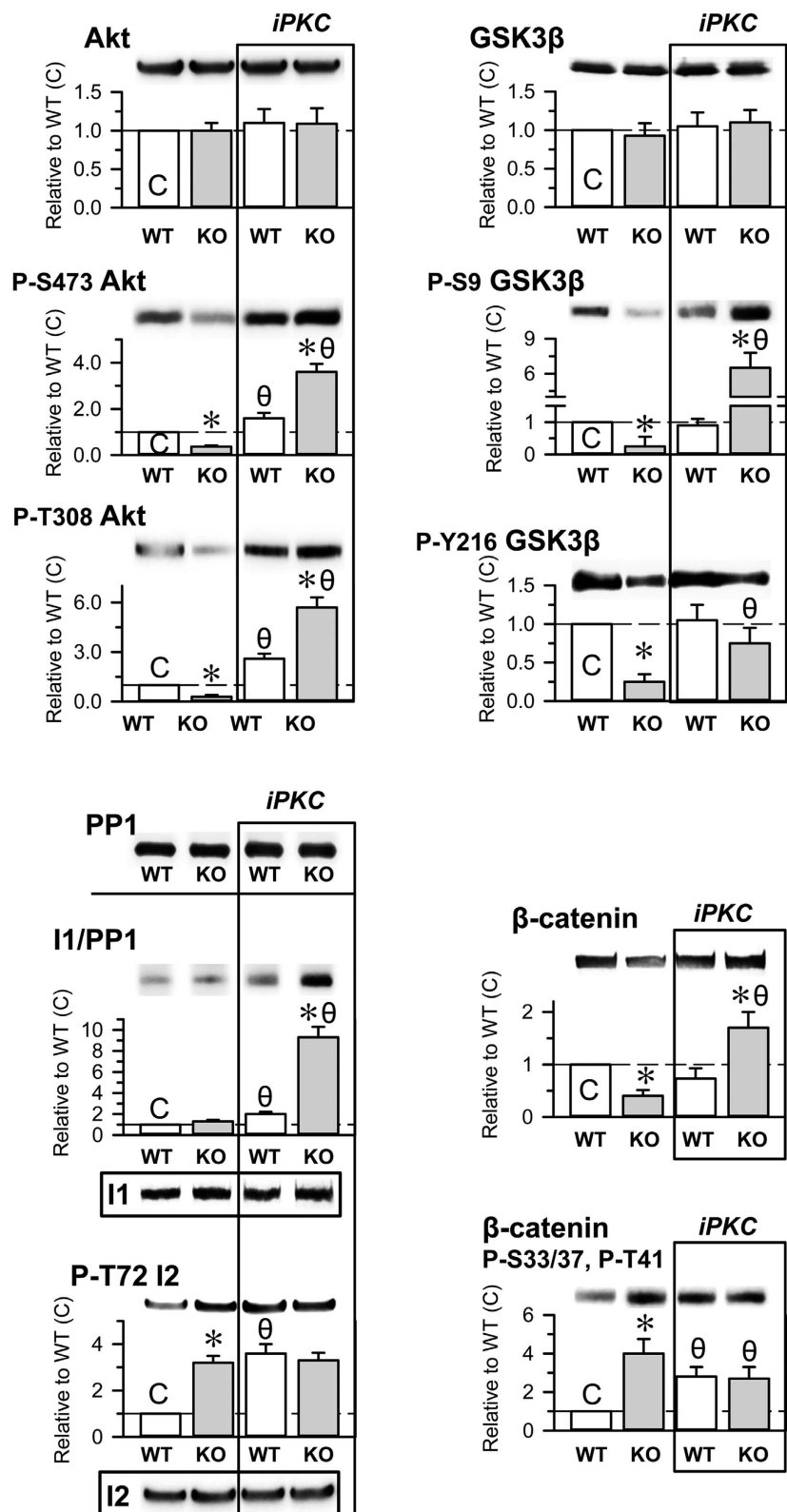


Figure 7. Effects of PKC inhibition on the Akt/GSK3 β signaling pathway in HINT1^{+/+} WT and HINT1^{-/-} KO mice. The iPKC G δ 7874 (1 nmol, icv) was injected 30 min before euthanasia. The levels of the signaling proteins and of their phosphorylated forms were determined in synaptosomes obtained from mouse prefrontal cortices. Representative blots are shown. Tubulin was used as a loading control. Each bar represents the mean \pm SEM of the data from at least three determinations, which were performed using different gels and blots. An arbitrary value of 1 was assigned to the control HINT1^{+/+} WT data (C). *Significant difference between the KO (grey bars) and the WT group (open bars); θ indicates a significant differences caused by G δ 7874 but within each group of mice, WT and KO. ANOVA, all pairwise Holm-Sidak multiple comparison tests, $p < 0.05$.

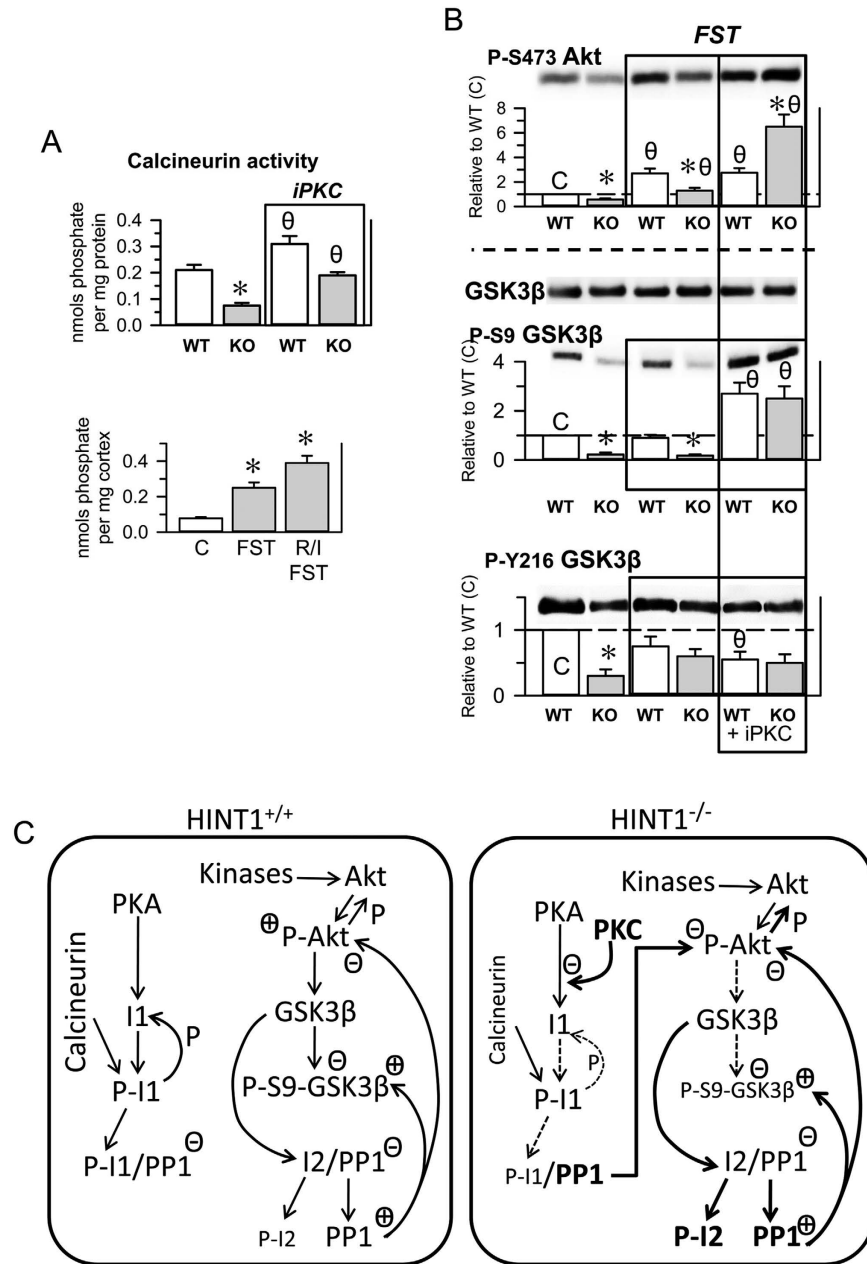


Figure 8. The effects of acute stress and PKC inhibition on calcineurin and Akt/GSK3 β signaling pathway. (A) Calcineurin enzymatic activity in prefrontal brain lysates from HINT1^{+/+} WT and HINT1^{-/-} KO mice (n = 6). The effects of iPKC (upper panel) or stress (FST, R/I) (lower panel) on enzymatic activity were evaluated. *Significant difference from HINT1^{+/+} WT/C. θ Significant difference with respect to the corresponding group not receiving iPKC. ANOVA, Dunnett multiple comparisons vs control group, $p < 0.05$. (B) Mice that received vehicle or iPKC Gö7874 (1 nmol, icv) were immediately euthanized after the FST, and their frontal cortices were processed for molecular analysis. *For each situation, control, FST and FST + iPKC, the data of KO mice were compared with those of WT mice. θ The data from WT and KO mice (FST and FST + Gö7874) were compared with those of naïve control mice. For the statistical analysis and additional details, see Fig. 7 and the Methods section. (C) Diagram showing altered Akt/GSK3 signaling pathways in HINT1^{-/-} mice. Key: PP1 (serine and threonine protein phosphatase 1), I1 (PP1 inhibitor 1), I2 (PP1 inhibitor 2), P- (phosphorylated forms), P-I1/PP1 (I1-dependent PP1 inhibition), I2/PP1 (I2-dependent PP1 inhibition), + and - (facilitation and inhibition of enzymatic activities). For details, see the main text.

issues, and HINT1^{-/-} mice exhibited behavioral and molecular alterations paralleling those described in BPD patients. Human symptomatic treatments, such as mood stabilizers and PKC or GSK3 β inhibitors, mostly affected the behavior of HINT1^{-/-} mice but had little or no effect on the behavior of HINT1^{+/+} WT mice.

Drug- and stress-free HINT1^{-/-} mice exhibited manic-like behaviors, such as those described in BStac mice, an animal model of human mania⁴¹. At the molecular level, manic-like behaviors manifest in conjunction with increases in GSK3 β activity³⁴. In our study, GSK3 β inhibitors, mood stabilizers, and agents such as lamotrigine or risperidone did not alter the behavior of HINT1^{+/+} WT mice but reduced the struggling and increased the immobility of HINT1^{-/-} and BStac mice during the FST. A growing body of evidence suggests that GSK3 β activity can be a suitable marker of mood diseases. At present, there is no direct and reliable method for evaluating GSK3 β activity; thus, its regulatory phosphorylations provide us with an index of its enzymatic activity.

Negative regulation of GSK3 β activity hinges primarily on Akt-mediated phosphorylation of GSK3 β at S9, whereas enhancement of its basal activity hinges on its phosphorylation at Y216³³. One should be cautious when estimating GSK3 β activity based on solely its S9 inhibitory phosphorylation because increases in substrate can override Akt-mediated GSK3 β inhibition⁴² and can thus lead to erroneous conclusions. In fact, the behavioral effects promoted by drugs or stressors that increase P-S9 GSK3 β levels usually diverge from those of direct inhibitors of GSK3 β function. Our study has provided several examples of such divergences. Thus, P-S9 GSK3 β was virtually nonexistent in HINT1^{-/-} mice but this phosphorylation was elevated in BStac mice, and both classes of mice showed manic-like behaviors typical of increased GSK3 β function. Citalopram and MK801 enhanced inhibitory P-S9 GSK3 β levels but increased the swim activity HINT1^{+/+} WT mice in the FST. In contrast, direct inhibitors of GSK3 β , such as TDZD8 and TCG24, did not exert such activating effects in these HINT1^{+/+} WT mice. PKC inhibition and acute stress increased P-S9 GSK3 β levels, and this time promoted depression-like behaviors diminishing HINT1^{-/-} mice's swim activity. However, in HINT1^{-/-} mice previously exposed to stress, citalopram and MK801, but not GSK3 β inhibitors, further increased inhibitory P-S9 GSK3 β levels but inhibited NMDAR-mediated pro-depressive conducts, thereby unveiling manic-like behaviors in these mice.

The aforementioned behavioral observations correlate better with the estimation of GSK3 β activity whether we take into account the simultaneous changes promoted by those treatments in P-S9 and P-Y216 GSK3 β levels. Y216 phosphorylation increases GSK3 β activity by approximately 200-fold³³; thus, this phosphorylation can increase GSK3 β enzymatic function, even in the setting of increases in P-S9 levels, such as those promoted by citalopram and MK801. Taking into account both phosphorylated forms of abovementioned behavioral changes, the activity of this enzyme in manic-like mice would be higher than in "control mice", e.g., "manic" BStac mice vs mice, and "manic" HINT1^{-/-} mice vs HINT1^{+/+} WT mice. Apart from the phosphorylation analysis, β -catenin levels BScr may serve as a marker of GSK3 β activity. GSK3 β phosphorylates β -catenin and promotes its degradation, which correlates with reductions in neurogenesis and the onset of depressive episodes. Unfortunately, a series of physiological alterations, such as those that occur in HINT1^{-/-} mice, compromise the suitability of β -catenin as a marker of GSK3 β activity. HIT family proteins, such as HINT1 and FHIT, inhibit β -catenin transcriptional activity⁴³; thus, in HINT1^{-/-} mice, increases in β -catenin activity may balance the negative effects of increased GSK3 β activity. In fact, we observed enhanced neurogenesis in HINT1^{-/-} mice exhibiting low P-S9 GSK3 β levels and decreased β -catenin levels. Increases in β -catenin transcriptional activity and PKC activity in these mice probably contributed to this finding⁴⁴.

The FST has been particularly useful for characterizing the differential behaviors and responses to treatment exhibited by HINT1^{-/-} mice. In this stressful paradigm, mice must overcome an aversive situation but must also avoid excessive exertion, which may be harmful. The balance between swim activity and its negative regulation (obstructing mechanisms) drives mouse behavior during this test. In humans, depression is associated with increased glutamate NMDAR activity, whose antagonism by ketamine leads to rapid, robust, and relatively sustained antidepressant effects in patients with treatment-resistant major depression that contrast with the delayed effects observed with the use of traditional antidepressants^{17,45}. Accordingly, drugs with antidepressant activity in humans and NMDAR blockers do not promote activity. On the contrary, they impede development of the mechanisms counteracting activity, resulting in enhanced mouse swim activity during the FST.

Comparative study of the behaviors exhibited by HINT1^{-/-} and BStac mice suggested the existence of a cross-regulatory relationship between the molecular mechanisms underpinning manic-like behaviors and those supporting depressive-like behaviors. A series of observations led us to propose this connection. For example, during the FST, HINT1^{+/+} WT mice and BScr mice exhibited citalopram- and MK801-sensitive depressive-like behaviors. However, "manic" BStac mice did not exhibit these behaviors. HINT1^{-/-} mice showed depressive-like behaviors, albeit to a limited extent. HINT1^{-/-} mice previously exposed to paradigms such as the FST, the TST, the resident-intruder test and even the activity cage exhibited a higher capacity to express such depressive-like behaviors than did the other mice. Therefore, BStac and HINT1^{-/-} mice exhibited manic-like behaviors in response to stress; however, only the latter mice developed depression-like behaviors. Long-term suppression of pro-depressive behaviors may facilitate the appearance of manic symptoms, similar to the case in depressive patients who may display such signs following long-term administration of antidepressants^{46,47}. Indeed, stressful environmental factors are believed to trigger the depressive phase in BPD patients, and tricyclic antidepressant use during depressive episodes can precipitate the expression of mania^{48,49}. In support of using HINT1^{-/-} mice as a model for human BPD, MK801 and, to a lesser extent, citalopram by reducing depression-like behaviors increased the activity of HINT1^{+/+} WT mice and rescued the manic-like state in stressed HINT1^{-/-} mice. It is possible that by negating the depressive-like component of mouse behavior, these drugs increase the activity of HINT1^{+/+} WT mice and unveil the manic-like hyperactivity of HINT1^{-/-} mice. Following this reasoning, the manic-activity of BStac mice prevents stress from triggering the mechanisms necessary to promote depressive-like behaviors. Alternatively, stress may trigger these mechanisms, but depressive-like behaviors barely express because of the quality of the manic-like behavior in these mice. Drugs reducing manic-like behaviors, such as mood stabilizers and GSK3 β inhibitors, diminished the swim vigor of BStac mice, thereby increasing their immobility periods in the FST. Importantly, MK801 revealed that BStac mice develop depressive-like behaviors under these circumstances.

It is therefore feasible that neural processes stimulating and obstructing the activity of the individual do not actually alternate but instead compete for predominance. In a normal subject, the outcome of this antagonism molds its conduct to fit the changing environment; however, if the strength of one or both antagonists compromises the real-time adaptation of the subject to the milieu, symptoms of mania, depression or even bipolar disorder may arise. In “manic” BStac mice, the strength of the mechanisms that promote activity predominates over the strength of the antagonists; however, in *HINT1*^{-/-} mice, stress triggers delayed depressive-like behavior. Thus, after several hours of being exposed to stressful situations, *HINT1*^{-/-} mice gradually behaved in a manner similar to that of *HINT1*^{+/+} WT mice in different experiments, including the FST and TST. Thereafter, *HINT1*^{-/-} mice rapidly manifested depressive-like behaviors in response to subsequent stressful situations. This acquired capacity persisted for a couple of weeks thereafter. Thus, testing of *HINT1*^{-/-} mice may bias their behavior in successive behavioral tests^{19,26, and present study}. To circumvent this drawback, with the exception of mice that we evaluated to determine the effects of acute stress on subsequent test outcomes, we used *HINT1*^{-/-} and *HINT1*^{+/+} WT control mice only once.

Our behavioral data support the use of *HINT1*^{-/-} mice as a model for studying and detecting drugs that have potential as treatments for human BPD. In addition, the fact that their molecular alterations parallel those described in BPD patients suggest that this model has potential as a means of studying certain functional aspects of this neural disease. In BPD, increases in PKC activity apparently contribute to the manic phase. Recent clinical assays involving the relatively selective iPKC tamoxifen have confirmed the importance of this target in BPD therapy¹⁰. PKA activity is also increased in bipolar mania patients and decreased in depressed patients⁵⁰. Accordingly, in this study, *HINT1*^{-/-} mice exhibited augmented PKC and PKA activity. Inhibition of these kinases reduced manic-like behaviors, thereby increasing the immobility of *HINT1*^{-/-} mice during the FST and TST. BStac mice also exhibited an increased PKC activity; however, its inhibition did not significantly affect the behavior of these “manic” mice during the FST^{29, and present study}. Thus, enhanced PKC activity does not necessarily support human mania but may support other features of the bipolar disorder^{14,51}. This interesting possibility raises the question of which mechanisms powered by PKC enable the kinase to facilitate such complex activity.

In mania, GSK3 β , PKC and PKA activity levels increase, but only GSK3 β inhibitors reduced the swim activity displayed by BStac and *HINT1*^{-/-} mice in the FST. PKC inhibition and emotional stress caused depressive-like behaviors only in *HINT1*^{-/-} mice, suggesting that additional physiological alterations account for this critical difference. Neuropathological studies revealed decreased expression of NR2A subunit transcripts in BPD patients¹². Although the levels of NR2A subunits were comparable between *HINT1*^{+/+} WT and *HINT1*^{-/-} mice, the levels of NR2B subunits were significantly increased in *HINT1*^{-/-} mice. The calcium channels of NMDARs containing NR2B, NR2C, or NR2D subunits have a lower probability of being open than those of NR2A-containing NMDARs. Thus, NR2B-containing NMDARs exhibit slower kinetics⁵² and make larger contributions to synaptic LTD, whereas NR2A/2B-containing NMDARs mostly mediate synaptic LTP^{53,54}. GSK3 β also plays an essential role in establishing this synaptic plasticity. Inhibition of GSK3 β favors NMDAR-mediated LTP, and activation of GSK3 β favors the LTD state⁵⁵. Thus, in *HINT1*^{-/-} mice, synaptic LTD prevails because of increases in the levels of NR2B subunits, inhibitory effects exerted by NR2B-containing NMDARs on NR2A-containing NMDARs⁵⁶, and increases in GSK3 β activity. The predominance of NR2A-containing NMDARs causes depressive-like episodes, while that of NR2B-containing NMDARs mainly causes manic-like episodes. Targeted deletion of the *NR2A* gene provokes manic-like behaviors in mice⁵⁷. These behaviors are spontaneously present in *HINT1*^{-/-} mice^{26, and present study}. In contrast, the levels of NR2A subunits are increased in the lateral amygdala of depressed patients⁵⁸ and in isolated rats⁵⁹ a rodent model for antidepressant detection⁶⁰.

BPD patients exhibit more creativity than healthy individuals⁶¹, and both BPD I and BPD II patients commonly exhibit this trait during hypomanic/manic episodes⁶². BPD patients exhibit poor performance with respect to visuospatial reasoning; however, they often exhibit high intellectual performance^{63,64}. Although these parameters are difficult to extrapolate to rodents, we have observed that NR2B-enriched *HINT1*^{-/-} mice exhibit increased passive-avoidance learning. BPD patients are essentially manic, but in response to environmental triggers, they can develop depression. This process requires concurrent malfunctions related to PKC and NMDAR activity. PKC regulates the function of NMDARs by direct serine phosphorylation of NR1 and NR2 subunits and via PKC-regulated Src-mediated tyrosine phosphorylation of NR2 subunits⁶⁵. *HINT1* binds to PKC and controls its activity; thus, *HINT1* deletions facilitate enhanced PKC activity and subsequent alterations in NMDAR activity, both of which relate to the pathophysiology of human BPD.

Therefore, alterations at NMDAR level apparently facilitate the differential responses exhibited by BStac and *HINT1*^{-/-} mice in response to stressful paradigms and pharmacological interventions. In the latter group of mice, the NR2B/NR2A and NMDAR/AMPA ratios increase, resulting in a predominance of NMDARs containing NR2B subunits and impaired LTD/LTP⁶⁶. PKC and NMDARs are important for neuronal development and circuit formation. Inhibition of PKC, or blockage of NMDARs, impairs the refinement of synaptic contacts suggesting that PKC participates in NMDAR-driven stabilization of developing synapses⁶⁷. The expression of NMDAR NR2 subunits changes during development, and at birth NR2B expresses at nearly adult levels and in cerebral cortex has a dominant role in NMDAR function. In the following weeks, and in response to environmental stimuli NR2A levels increase throughout the brain⁶⁸. NR2A and NR2B have both overlapping and distinct functions in dendritic development⁶⁹, and the switch in synaptic NR2A subunit predominance implies the formation of new synapses from which NR2B is lacking⁷⁰. PKC by increasing the probability of channel opening enhances the function of NR2A- but not of NR2B-containing NMDARs⁷¹. In this scenario, during brain development an abnormal high PKC function may reduce expression of its target, NR2A subunits, resulting in predominance of NR2B-enriched NMDARs. In late stages, these changes would produce alterations in brain circuitry and development such as these causing the BPD. In fact, reductions on NR2A subunit expression such as those observed in animal models of traumatic injury to the immature brain, impairs experience-dependent neuroplasticity⁷².

HINT1 proteins coordinate with sigma 1 receptors to support cross-regulation between GPCRs and glutamate NMDARs. Only NMDARs carrying NR1 subunits with the cytosolic C1 segment can couple with GPCRs via HINT1 proteins²². The lack of HINT1 proteins impairs the capacity of GPCRs to enhance NMDAR function. Thus, in HINT1^{-/-} mice, increases in NR1 C1 subunits and higher sensitivity to synaptic activators apparently compensate for NMDAR hypofunction^{20, and present study}. In these mice, increased PKC activity augments GSK3 β function, which, among other effects, diminishes the presynaptic release of glutamate, as well as that of other neurotransmitters⁵⁵. Acute stress, PKC inhibition and certain GSK3 β inhibitors increase neurotransmitter release, causing overactivation of their altered NMDARs and the subsequent development of depression-like behaviors. The pMCAO ictus model revealed the presence of NMDAR hypofunction in HINT1^{-/-} mice and demonstrated an increase in the sensitivity of these glutamate receptors to their specific activators^{20,22, and present study}. MK801 prevented emotional stress from precipitating depressive-like behaviors in HINT1-deficient mice. Similarly, ketamine and memantine can counteract depressive symptoms and reduce mood cycling in BPD patients⁷³⁻⁷⁵, suggesting that these patients may suffer from alterations in NMDAR function comparable to those observed in HINT1^{-/-} mice. Inhibition of GSK3 β by TDZD8 or TCG24 reduced the manic-like activity of HINT1^{-/-} mice. In these circumstances, citalopram or MK801 affected their modified behavior to only a limited extent. It is therefore possible that reductions in the activity of pro-manic mechanisms cause balance between the physiological processes promoting and obstructing mouse activity. Thus, inhibition of GSK3 β by weakening stress-induced activity mechanisms indirectly reduces the reactive NMDAR-mediated depressive-like behaviors.

The calcium and calmodulin-dependent phosphatase calcineurin can diminish P-S9 GSK3 β levels, and thus exert pro-mania effects. However, the activity of this phosphatase was reduced in HINT1^{-/-} mice, probably because of PKC-mediated activation of its inhibitor Cabin/Cain³⁹. Thus, PKC can regulate the levels of inhibitory P-S9 GSK3 β by controlling the opposed activities of Akt and calcineurin on this target. Regarding the possible role of PKC in mania, in “manic” BStac mice PKC inhibition reduced amphetamine-induced hyperactivity in the activity cage but barely diminished their swim activity in the FST. It is worth noting that inhibition of PKC increased P-S9 GSK3 β but did not diminish the activating P-Y216 form, which clearly prevailed in BStac mice. Thus, PKC just controls the activity of a limited pool of GSK3 β ^{29, and present study}, enough to dampen the effects of psychostimulants but not the effects of more stressful paradigms, such as the FST. In BStac mice, high P-Y216 GSK3 β levels prevented PKC inhibition from reducing their manic-like behavior via increases of P-S9 GSK3 β . In HINT1^{-/-} mice, GSK3 β regulatory phosphorylation levels were moderate and below those seen in HINT1^{+/+} WT mice. This observation raises the question of whether low P-Y216 GSK3 β levels such as those observed in HINT1^{-/-} mice can promote manic-like behaviors. Notably, in HINT1-deficient mice PKC inhibition reduced amphetamine-induced hyperactivity and increased their immobility period in the FST. It is worth noting that HINT1^{+/+} WT, BScr or BStac mice did not exhibit increased NR2B/NR2A ratios, and in these mice PKC inhibition did not change or moderately changed their behavior during the FST. Thus, our data suggest that in HINT1^{-/-} mice the PKC-regulated pool of GSK3 β collaborate with NR2B-enriched NMDARs to facilitate synaptic LTD, which may explain the simultaneous involvement of GSK3 β and PKC in bipolar mania. In fact, PKC and Akt/GSK3 β pathway have been implicated in environment-driven changes in the mood of BPD patients⁷⁶, and our data on PKC and NR2B-enriched NMDARs certainly support the participation of this pathway in these processes. Therefore, enhanced PKC activity in combination with an anomalous NMDAR apparently supports bipolar mania and diminishes stress-mediated recruitment of depressive-like behaviors.

Our study of HINT1^{-/-} mice produced some results that may be relevant to the treatment of human BPD. Our findings regarding the involvement of PKC in BPD indicate that drugs that selectively reduce PKC activity may be therapeutically relevant. The inhibition of PKC reduces pro-manic mechanisms mostly by increasing the availability of NMDAR-dependent depressive behaviors. Indeed, the reported efficacy of tamoxifen in BPD patients¹⁰ indicates that it may be possible to reduce bipolar mania without triggering excess depressive behaviors. Given that a balance exists between these opposing behaviors, treatments that selectively reduce the pro-manic activity of the mice would indirectly promote reactive depression, but of moderate strength. Valproate and most direct inhibitors of GSK3 β exert these effects. We cannot discount the possibility that chronic administration of these drugs may affect PKC activity in addition to exerting the effects described above; however, they may still be of therapeutic interest.

Certain GSK3 β inhibitors can also promote antidepressant-like effects^{77,78, and present study}. We observed that 3F8 moderately decreased NMDAR-induced behaviors in HINT1^{+/+} WT mice. However, in mice with increased GSK3 β activity, *i.e.*, HINT1^{-/-} and BStac mice, 3F8 barely decreased activity-directed behaviors and recruited NMDAR-mediated depressive-like behaviors. We compared the behavioral effects of 3F8 with those of iPKCs in HINT1^{-/-} mice. iPKCs exhibited a tendency to reduce HINT1^{+/+} WT mice swim activity, but in other mouse strains they clearly exerted antidepressant-like effects⁷⁹. Splicing of the GSK3 β gene probably accounts for the differences in the ability of GSK3 β inhibitors to recruit NMDAR function. A minor (approximately 15% of total) splice variant of GSK3 β known as GSK3 β 2 has a 13-residue insert in its kinase domain and exhibits reduced activity in the presence of several GSK3 β substrates. GSK3 β 2 localizes primarily to neuronal cell bodies, where the majority of NMDARs reside. The un-spliced GSK3 β is also present in neuronal processes⁸⁰, including pre-synaptic terminals, where it can control glutamate release. GSK3 β inhibitors that can affect the activity of both forms of the enzyme, such as 3F8, could also mimic the beneficial effects of iPKCs in BPD patients.

Thus, the observations from this and previous studies suggest that depression and mania may coexist as opposing forces instead of alternating during BPD. The outcome of this emotional antagonism results in mood swings typical of this mental disorder. The HINT1-knockout mouse is a valid model of human BPD that may be used to discover novel drugs, identify alternative pharmacological targets, and customize treatment protocols dependent on the participation of NMDARs in specific phases of the disease.

Methods

Animals. Knock-out mice with the genetic background of 129 mice and exhibiting targeted disruption of the *HINT1* gene (*HINT1*^{-/-}, a gift from I.B. Weinstein/J.B. Wang), WT littermate mice (*HINT1*^{+/+}), and two strains of Black Swiss (BS) mice from the Charles River and Taconic Farms (USA) were used in this study. *HINT1*^{-/-} mice exhibited no noticeable differences from their *HINT1*^{+/+} WT littermates with respect to appearance, body size, histologic or morphologic parameters⁸¹. Genotyping was performed using a previously described protocol⁸², and homozygous transgenic mice were selected and used together with *HINT1*^{+/+} WT mice in all assays. Male mice were housed at a constant temperature (22 ± 1 °C) under a 12/12 h light-dark cycle and were allowed unlimited access to food and water. To reduce the risk of social stress, mice from the same litter were grouped together remained in these groups throughout the study. The mice were also provided extra space for comfort, as well as nesting material (e.g., soft paper and cardboard refuge) and small pieces of chewable wood. Experiments were regularly performed in different cohorts of mice to avoid any variations caused by handling stress or exposure to stressful paradigms. Because stress determines the subsequent behavior of *HINT1*^{-/-} mice, all the mice were used only once. An exception was made for the mice that were used in experiments designed to study the influence of stress on behavior. These animals were used twice. Molecular determinations were performed in mice that received only the drugs under study and in mice that were also subjected to the corresponding behavioral tests after drugs administration. All experiments were performed according to the European regulations for experimental work with animals (directive 2010/63/EU) and were approved by the Ethics Committee for Animal Research of CSIC. Behavioral test procedures are provided in the Supplementary Information.

Membrane preparation and protein detection. These procedures used for these assays have been described extensively elsewhere^{22,83}. Briefly, frontal cortices were obtained from groups of 6 to 10 mice that were euthanized via decapitation. Proteins from solubilized synaptosomes were resolved by SDS/polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), transferred onto 0.2 μm polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (#162-0176, Bio-Rad, Madrid, Spain), probed overnight at 6 °C with the appropriate primary antibodies (see Supplementary Information) diluted in Tris buffered saline (pH 7.7) + 0.05% Tween-20, and then detected with the appropriate secondary antibodies (2 h) conjugated to horseradish peroxidase. Antibody binding was visualized via chemiluminescence (#170-5061, Bio-Rad, Madrid, Spain) and was recorded with a ChemImager IS-5500 (Alpha Innotech, San Leandro, California). Densitometry was performed using Quantity One software (Bio-Rad), and the results are expressed as the mean of the integrated volume (average optical density of the pixels within the object area/mm²).

Enzymatic activity. Pep tag protein kinase C and protein kinase A assays (Promega V5330 and V5340) were performed to assess total kinase enzymatic activity. The supernatants from cortical brain lysates were incubated with specific substrates. The peptides that served as substrate were separated according to their net charges via electrophoresis on a 0.8% agarose gel in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0). A colorimetric assay kit (Enzo, BML-AK816-0001) was used to measure cellular calcineurin (PP2B) phosphatase activity, according to the manufacturer's instructions.

Permanent focal cerebral ischemia (pMCAO) and determination of infarct size. Focal cerebral ischemia was induced via permanent occlusion of the middle cerebral artery (pMCAO), as previously described²². Briefly, a small craniotomy incision was made over the trunk of the right middle cerebral artery (MCA) and above the rhinal fissure. After its identification, the dura mater was resected, and the MCA was ligated just before the bifurcation of its frontal and parietal branches using 9-0 suture. Sham-operated animals were subjected to an identical procedure, although their MCAs were not ligated. Following surgery, the mice were returned to their cages, where they were maintained at room temperature and allowed free access to food and water. Complete interruption of blood flow was confirmed via an operating microscope. For infarct size determination at 48 hours after MCAO, magnetic resonance imaging was performed using a BIOSPEC BMT 47/40 (Bruker, Ettlingen, Germany), and infarct volumes were calculated from T2-weighted images using ImageJ 1.44l software (NIH, Bethesda, MD, USA).

Artwork and statistical analysis. All graphs and statistical analyses were generated and performed using the Sigmaplot/SigmaStat v.13 package (SPSS Science Software, Erkrath, Germany). Significance was defined as $p < 0.05$. Data were analyzed using paired t test, or one-way ANOVA followed by all pairwise Holm-Sidak multiple comparison tests or Dunnett multiple comparisons vs the control group, as indicated in the legends to the Figures.

References

1. Logan, R. W. & McClung, C. A. Animal models of bipolar mania: The past, present and future. *Neuroscience* **321**, 163–188 (2016).
2. Koenders, M. A. *et al.* Stressful life events in bipolar I and II disorder: cause or consequence of mood symptoms? *J Affect. Disord.* **161**, 55–64 (2014).
3. Proudfoot, J., Doran, J., Manicavasagar, V. & Parker, G. The precipitants of manic/hypomanic episodes in the context of bipolar disorder: a review. *J Affect. Disord.* **133**, 381–387 (2011).
4. Proudfoot, J. *et al.* Triggers of mania and depression in young adults with bipolar disorder. *J Affect. Disord.* **143**, 196–202 (2012).
5. Cosgrove, V. E., Kelsoe, J. R. & Suppes, T. Toward a Valid Animal Model of Bipolar Disorder: How the Research Domain Criteria Help Bridge the Clinical-Basic Science Divide. *Biol. Psychiatry* **79**, 62–70 (2016).
6. Gould, T. D. & Einat, H. Animal models of bipolar disorder and mood stabilizer efficacy: a critical need for improvement. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **31**, 825–831 (2007).
7. Cryan, J. F. & Slattery, D. A. Animal models of mood disorders: Recent developments. *Curr. Opin. Psychiatry* **20**, 1–7 (2007).
8. Overstreet, D. H., Friedman, E., Mathe, A. A. & Yadid, G. The Flinders Sensitive Line rat: a selectively bred putative animal model of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **29**, 739–759 (2005).

9. Einat, H. Different behaviors and different strains: potential new ways to model bipolar disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **31**, 850–857 (2007).
10. Zarate, C. A. & Manji, H. K. Protein kinase C inhibitors: rationale for use and potential in the treatment of bipolar disorder. *CNS. Drugs* **23**, 569–582 (2009).
11. Mundo, E. *et al.* Evidence that the N-methyl-D-aspartate subunit 1 receptor gene (GRIN1) confers susceptibility to bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* **8**, 241–245 (2003).
12. McCullumsmith, R. E. *et al.* Decreased NR1, NR2A, and SAP102 transcript expression in the hippocampus in bipolar disorder. *Brain Res.* **1127**, 108–118 (2007).
13. Chitty, K. M., Lagopoulos, J., Hickie, I. B. & Hermens, D. F. Hippocampal glutamatergic/NMDA receptor functioning in bipolar disorder: A study combining mismatch negativity and proton magnetic resonance spectroscopy. *Psychiatry Res.* **233**, 88–94 (2015).
14. Hahn, C. G. & Friedman, E. Abnormalities in protein kinase C signaling and the pathophysiology of bipolar disorder. *Bipolar. Disord.* **1**, 81–86 (1999).
15. Chang, A., Li, P. P. & Warsh, J. J. Altered cAMP-dependent protein kinase subunit immunolabeling in post-mortem brain from patients with bipolar affective disorder. *J Neurochem.* **84**, 781–791 (2003).
16. Mathews, D. C., Henter, I. D. & Zarate, C. A. Targeting the glutamatergic system to treat major depressive disorder: rationale and progress to date. *Drugs* **72**, 1313–1333 (2012).
17. Naughton, M., Clarke, G., O’Leary, O. F., Cryan, J. F. & Dinan, T. G. A review of ketamine in affective disorders: current evidence of clinical efficacy, limitations of use and pre-clinical evidence on proposed mechanisms of action. *J Affect. Disord.* **156**, 24–35 (2014).
18. Zhang, F., Fang, Z. & Wang, J. B. Hint1 knockout results in a compromised activation of protein kinase C gamma in the brain. *Brain Res.* **1622**, 196–203 (2015).
19. Varadarajulu, J. *et al.* Increased anxiety-related behaviour in Hint1 knockout mice. *Behav. Brain Res.* **220**, 305–311 (2011).
20. Vicente-Sánchez, A., Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M. & Garzón, J. HINT1 protein cooperates with cannabinoid 1 receptor to negatively regulate glutamate NMDA receptor activity. *Mol. Brain* **6**, 42 (2013).
21. Liu, Q., Puche, A. C. & Wang, J. B. Distribution and expression of protein kinase C interactive protein (PKCI/HINT1) in mouse central nervous system (CNS). *Neurochem. Res.* **33**, 1263–1276 (2008).
22. Rodríguez-Muñoz, M., Cortés-Montero, E., Pozo-Rodríguez, A., Sánchez-Blázquez, P. & Garzón-Niño, J. The ON:OFF switch, sigma1R-HINT1 protein, controls GPCR-NMDA receptor cross-regulation: Implications in neurological disorders. *Oncotarget* **6**, 35458–35477 (2015).
23. Rodríguez-Muñoz, M. & Garzón, J. Nitric Oxide and Zinc-Mediated Protein Assemblies Involved in Mu Opioid Receptor Signaling. *Mol. Neurobiol.* **48**, 769–782 (2013).
24. Robertson, H. R. & Feng, G. Annual Research Review: Transgenic mouse models of childhood-onset psychiatric disorders. *J Child Psychol. Psychiatry* **52**, 442–475 (2011).
25. Elashoff, M. *et al.* Meta-analysis of 12 genomic studies in bipolar disorder. *J Mol. Neurosci.* **31**, 221–243 (2007).
26. Barbier, E. & Wang, J. B. Anti-depressant and anxiolytic like behaviors in PKCI/HINT1 knockout mice associated with elevated plasma corticosterone level. *BMC. Neurosci.* **10**, 132 (2009).
27. Barbier, E. *et al.* Supersensitivity to amphetamine in protein kinase-C interacting protein/HINT1 knockout mice. *Neuropsychopharmacology* **32**, 1774–1782 (2007).
28. Einat, H. Modelling facets of mania—new directions related to the notion of endophenotypes. *J Psychopharmacol.* **20**, 714–722 (2006).
29. Einat, H. Partial effects of the protein kinase C inhibitor chelerythrine in a battery of tests for manic-like behavior in black Swiss mice. *Pharmacol. Rep.* **66**, 722–725 (2014).
30. Kalinichev, M. & Dawson, L. A. Evidence for antimanic efficacy of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) inhibitors in a strain-specific model of acute mania. *Int. J Neuropsychopharmacol.* **14**, 1051–1067 (2011).
31. Juetten, J. & Einat, H. Behavioral differences in black Swiss mice from separate colonies: implications for modeling domains of mania. *Behav. Pharmacol.* **23**, 211–214 (2012).
32. Bhat, R. V. *et al.* Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **97**, 11074–11079 (2000).
33. Hughes, K., Nikolakaki, E., Plyte, S. E., Totty, N. F. & Woodgett, J. R. Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J* **12**, 803–808 (1993).
34. Polter, A. *et al.* Deficiency in the inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 increases sensitivity to mood disturbances. *Neuropsychopharmacology* **35**, 1761–1774 (2010).
35. Wang, H. Y., Markowitz, P., Levinson, D., Undie, A. S. & Friedman, E. Increased membrane-associated protein kinase C activity and translocation in blood platelets from bipolar affective disorder patients. *J Psychiatr. Res.* **33**, 171–179 (1999).
36. Einat, H., Yuan, P., Szabo, S. T., Dogra, S. & Manji, H. K. Protein kinase C inhibition by tamoxifen antagonizes manic-like behavior in rats: implications for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Neuropsychobiology* **55**, 123–131 (2007).
37. Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M., Bailón, C. & Garzón, J. GPCRs promote the release of zinc ions mediated by nNOS/NO and the Redox transducer RGSZ2 protein. *Antioxid. Redox. Signal.* **17**, 1163–1177 (2012).
38. Simon, R. P., Swan, J. H., Griffiths, T. & Meldrum, B. S. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* **226**, 850–852 (1984).
39. Sun, L. *et al.* Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity.* **8**, 703–711 (1998).
40. Wen, H. C., Huang, W. C., Ali, A., Woodgett, J. R. & Lin, W. W. Negative regulation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt signalling pathway by PKC. *Cell Signal.* **15**, 37–45 (2003).
41. Hannah-Poquette, C. *et al.* Modeling mania: Further validation for Black Swiss mice as model animals. *Behav. Brain Res.* **223**, 222–226 (2011).
42. Beurel, E., Grieco, S. F. & Jope, R. S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol. Ther.* **148**, 114–131 (2015).
43. Huber, O. & Weiske, J. Beta-catenin takes a HIT. *Cell Cycle* **7**, 1326–1331 (2008).
44. Abrial, E. *et al.* Protein kinase C regulates mood-related behaviors and adult hippocampal cell proliferation in rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **43**, 40–48 (2013).
45. Maeng, S. & Zarate, C. A. Jr. The role of glutamate in mood disorders: results from the ketamine in major depression study and the presumed cellular mechanism underlying its antidepressant effects. *Curr. Psychiatry Rep.* **9**, 467–474 (2007).
46. Martin, A. *et al.* Age effects on antidepressant-induced manic conversion. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med* **158**, 773–780 (2004).
47. Patel, R. *et al.* Do antidepressants increase the risk of mania and bipolar disorder in people with depression? A retrospective electronic case register cohort study. *BMJ Open.* **5**, e008341 (2015).
48. Henry, C., Sorbara, F., Lacoste, J., Gindre, C. & Leboyer, M. Antidepressant-induced mania in bipolar patients: identification of risk factors. *J Clin. Psychiatry* **62**, 249–255 (2001).
49. Pary, R., Matuschka, P. R., Lewis, S. & Lippmann, S. Managing bipolar depression. *Psychiatry (Edmont)* **3**, 30–41 (2006).
50. Dwivedi, Y. & Pandey, G. N. Adenylyl cyclase-cyclicAMP signaling in mood disorders: role of the crucial phosphorylating enzyme protein kinase A. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **4**, 161–176 (2008).
51. Friedman, E., Hoau, Y. W., Levinson, D., Connell, T. A. & Singh, H. Altered platelet protein kinase C activity in bipolar affective disorder, manic episode. *Biol. Psychiatry* **33**, 520–525 (1993).

52. Fountoulakis, K. N. The possible involvement of NMDA glutamate receptor in the etiopathogenesis of bipolar disorder. *Curr. Pharm. Des* **18**, 1605–1608 (2012).
53. France, G. *et al.* Multiple roles of GluN2B-containing NMDA receptors in synaptic plasticity in juvenile hippocampus. *Neuropharmacology* (2016).
54. Paoletti, P., Bellone, C. & Zhou, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 383–400 (2013).
55. Zhu, L. Q. *et al.* Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits long-term potentiation with synapse-associated impairments. *J Neurosci.* **27**, 12211–12220 (2007).
56. Mallon, A. P., Auberson, Y. P. & Stone, T. W. Selective subunit antagonists suggest an inhibitory relationship between NR2B and NR2A-subunit containing N-methyl-D- aspartate receptors in hippocampal slices. *Exp. Brain Res.* **162**, 374–383 (2005).
57. Boyce-Rustay, J. M. & Holmes, A. Genetic inactivation of the NMDA receptor NR2A subunit has anxiolytic- and antidepressant-like effects in mice. *Neuropsychopharmacology* **31**, 2405–2414 (2006).
58. Karolewicz, B. *et al.* Elevated levels of NR2A and PSD-95 in the lateral amygdala in depression. *Int. J Neuropsychopharmacol.* **12**, 143–153 (2009).
59. Turnock-Jones, J. J. *et al.* Increased expression of the NR2A NMDA receptor subunit in the prefrontal cortex of rats reared in isolation. *Synapse* **63**, 836–846 (2009).
60. Garzón, J., Fuentes, J. A. & Del Río, J. Antidepressants selectively antagonize the hyperactivity induced in rats by long-term isolation. *Eur. J Pharmacol.* **59**, 293–296 (1979).
61. Simeonova, D. I., Chang, K. D., Strong, C. & Ketter, T. A. Creativity in familial bipolar disorder. *J Psychiatr. Res.* **39**, 623–631 (2005).
62. McCraw, S., Parker, G., Fletcher, K. & Friend, P. Self-reported creativity in bipolar disorder: prevalence, types and associated outcomes in mania versus hypomania. *J Affect. Disord.* **151**, 831–836 (2013).
63. MacCabe, J. H. *et al.* Excellent school performance at age 16 and risk of adult bipolar disorder: national cohort study. *Br. J Psychiatry* **196**, 109–115 (2010).
64. Tiihonen, J. *et al.* Premorbid intellectual functioning in bipolar disorder and schizophrenia: results from a cohort study of male conscripts. *Am. J Psychiatry* **162**, 1904–1910 (2005).
65. Jones, M. L. & Leonard, J. P. PKC site mutations reveal differential modulation by insulin of NMDA receptors containing NR2A or NR2B subunits. *J Neurochem.* **92**, 1431–1438 (2005).
66. Hall, B. J., Ripley, B. & Ghosh, A. NR2B signaling regulates the development of synaptic AMPA receptor current. *J Neurosci.* **27**, 13446–13456 (2007).
67. Schmidt, J. T., Fleming, M. R. & Leu, B. Presynaptic protein kinase C controls maturation and branch dynamics of developing retinotectal arbors: possible role in activity-driven sharpening. *J Neurobiol.* **58**, 328–340 (2004).
68. Wenzel, A., Fritschy, J. M., Mohler, H. & Benke, D. NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem.* **68**, 469–478 (1997).
69. Ewald, R. C., Van Keuren-Jensen, K. R., Aizenman, C. D. & Cline, H. T. Roles of NR2A and NR2B in the development of dendritic arbor morphology *in vivo*. *J Neurosci.* **28**, 850–861 (2008).
70. Liu, X. B., Murray, K. D. & Jones, E. G. Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *J Neurosci.* **24**, 8885–8895 (2004).
71. Xiong, Z. G. *et al.* Regulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by constitutively active protein kinase C. *Mol. Pharmacol.* **54**, 1055–1063 (1998).
72. Giza, C. C., Maria, N. S. & Hovda, D. A. N-methyl-D-aspartate receptor subunit changes after traumatic injury to the developing brain. *J Neurotrauma* **23**, 950–961 (2006).
73. McGirr, A. *et al.* A systematic review and meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials of ketamine in the rapid treatment of major depressive episodes. *Psychol. Med* **45**, 693–704 (2015).
74. Fond, G. *et al.* Ketamine administration in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Psychopharmacology (Berl)* **231**, 3663–3676 (2014).
75. Serra, G. *et al.* Three-year, naturalistic, mirror-image assessment of adding memantine to the treatment of 30 treatment-resistant patients with bipolar disorder. *J Clin. Psychiatry* **76**, e91–e97 (2015).
76. Del'Guidice, T. & Beaulieu, J. M. [Psychotropic drugs and the involvement of the Akt/GSK3 signalling pathway in mental illnesses]. *Med Sci (Paris)* **26**, 647–651 (2010).
77. Gould, T. D., Einat, H., Bhat, R. & Manji, H. K. AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. *Int. J Neuropsychopharmacol.* **7**, 387–390 (2004).
78. Kaidanovich-Beilin, O., Milman, A., Weizman, A., Pick, C. G. & Eldar-Finkelman, H. Rapid antidepressant-like activity of specific glycogen synthase kinase-3 inhibitor and its effect on beta-catenin in mouse hippocampus. *Biol. Psychiatry* **55**, 781–784 (2004).
79. Galeotti, N. & Ghelardini, C. Antidepressant phenotype by inhibiting the phospholipase Cbeta(1)-protein kinase Cgamma pathway in the forced swim test. *Neuropharmacology* **60**, 937–943 (2011).
80. Mukai, F., Ishiguro, K., Sano, Y. & Fujita, S. C. Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *J Neurochem.* **81**, 1073–1083 (2002).
81. Su, T. *et al.* Deletion of histidine triad nucleotide-binding protein 1/PKC-interacting protein in mice enhances cell growth and carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **100**, 7824–7829 (2003).
82. Rodriguez-Muñoz, M. *et al.* The histidine triad nucleotide-binding protein 1 supports mu-opioid receptor-glutamate NMDA receptor cross-regulation. *Cell Mol Life Sci* **68**, 2933–2949 (2011).
83. Garzón, J., Rodriguez-Muñoz, M. & Sánchez-Blázquez, P. Direct association of Mu-opioid and NMDA glutamate receptors supports their cross-regulation: molecular implications for opioid tolerance. *Curr. Drug Abuse Rev.* **5**, 199–226 (2012).

Acknowledgements

This work was supported by grants of “Plan Nacional de Drogas” 2014-012 (PSB) and MINECO, SAF-2015-65420R (JGN). We would like to thank Gabriela de Alba and Carmelo Aguado for their excellent technical assistance.

Author Contributions

J.G.N. provided funding, designed and interpreted the experiments and generated article text and figures. M.R.M. and E.C.M. performed the experiments. P.S.B. provided funding, performed the experiments and generated article text.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Garzón-Niño, J. *et al.* Increased PKC activity and altered GSK3 β /NMDAR function drive behavior cycling in HINT1-deficient mice: bipolarity or opposing forces. *Sci. Rep.* **7**, 43468; doi: 10.1038/srep43468 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

REGULAR RESEARCH ARTICLE

Sigma 1 Receptor Antagonists Inhibit Manic-Like Behaviors in Two Congenital Strains of Mice

Pilar Sánchez-Blázquez, Elsa Cortés-Montero, María Rodríguez-Muñoz, Javier Garzón

Neuropharmacology, Department of Translational Neurosciences, Instituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain.

P.S.-B. and E.C.-M. contributed equally to this study.

Correspondence: Javier Garzón, PhD, Neurofarmacología, Instituto Cajal, Avenida Doctor Arce 37, 28002 Madrid, Spain (jgarzon@cajal.csic.es).

Abstract

Background: Several currently available animal models reproduce select behavioral facets of human mania as well as the abnormal glutamatergic neurotransmission and dysregulation of glycogen synthase kinase 3 β that accompanies this disease.

Methods: In this study, we addressed the therapeutic potential of ligands of sigma receptor type 1 (σ 1R) in 2 putative models of mania: the “manic” Black Swiss outbred mice from Taconic farms (BStac) and mice with the 129 genetic background and histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) deletion (HINT1^{-/-} mice) that exhibit bipolar-like behaviors.

Results: The activity of control mice, which do not exhibit manic-like behaviors in the forced swim test, was significantly enhanced by MK801, an inhibitor of glutamate N-methyl-D-aspartate receptor activity, an effect that was not or barely observed in manic-like mice. Typical mood stabilizers, such as glycogen synthase kinase 3 β inhibitors, but not σ 1R ligands, reduced the N-methyl-D-aspartate receptor-mediated behaviors in control mice. Notably, σ 1R antagonists S1RA, PD144418, BD1047, and BD1063, but not σ 1R agonists PRE084 and PPCC, attenuated the manic-like behaviors of BStac and HINT1^{-/-} mice by increasing antiactivity behaviors. The antimanic effects of σ 1R antagonists persisted for at least 24 hours, and these drugs did not alter the behavior of the “bipolar” HINT1^{-/-} mice during pro-depressive episodes.

Conclusions: σ 1R antagonists exhibit a selective normalizing effect on specific behavioral domains of mania without altering control (normal) or depressive-like behaviors.

Keywords: mania, sigma receptor type 1, mood stabilizers, NMDA receptor, HINT1 protein

Introduction

Mania has long been recognized as aberrant behavior indicative of mental illness. Manic states include a variety of complex and multifaceted symptoms that create a challenge for the establishment of clear clinical distinctions (Cassidy et al., 1998a, 1998b; Grunze et al., 2009). Recent factor analyses of manic signs and symptoms (Gupta et al., 2011; Young et al., 2011) have identified between 4 and 7 independent factors, including dysphoria (characterized by anxiety and depressed mood associated with mixed episodes), psychomotor acceleration (increased motor activity, pressured speech), psychosis (grandiosity, psychotic

symptoms), and irritability/aggression. Despite the diversity of manic subgroups (irritable, euphoric, psychotic, depressed), psychomotor agitation appears to be a common denominator, leading some to hypothesize that increased activation or “overactivity” represents the core underlying feature of mania (Savitz et al., 2005; Perry et al., 2010). In the context of clinical therapeutics, the etiology and pathophysiology of the disease remains unclearly defined. Notwithstanding, abnormal glutamatergic neurotransmission has been implicated in the pathophysiology of acute mania (Ongür et al., 2008; Gao et al.,

Received: January 5, 2018; Revised: May 4, 2018; Accepted: May 30, 2018

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press on behalf of CINP.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

Significance Statement

Mania had long been recognized as an aberrant behavior indicative of mental illness. The present study explored the potential of sigma 1 receptor ligands as antimanic/mood stabilizers in 2 validated animal models of mania, a specific strain of Black Swiss mice from Taconic and mice with genetic deletion of the HINT1 protein. The antagonists of the sigma 1 receptor diminished the incidence of specific behavioral domains of mania without modifying the behavior of control mice. Thus, our data evidence the potential of these drugs to improve the quality of life of subjects affected by such manic disease.

2013). Glial dysfunction has also been proposed to be important to this pathology (Mitterauer, 2011). In fact, a multitude of studies have found reduced glial cell number to be associated with acute mania (Rajkowska, 2000; Ongür et al., 2008). At the molecular level, dysregulation of kinases such as glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) (Jope and Roh, 2006) and PKC (Manji and Lenox, 1999) may occur. In fact, neurotransmitter systems that are implicated in the pathophysiology of mood disorders regulate GSK3 β /PKC in the brain.

Several currently available animal models reproduce select behavioral facets of human mania and may be used to reliably detect novel drugs that may be administered for palliative treatment of this disease. Black Swiss (BS) mice exhibit an increased motor activity compared with C57bl/6, CBA/J, and A/J strains (Flaisher-Grinberg and Einat, 2010; Hannah-Poquette et al., 2011). BS mice from Taconic (BStac) show a higher preference for sweet solutions and higher motor activity than other BS mouse colonies, that is, from Charles River (BScr). A series of studies from different groups has provided the etiological validity supporting the utilization of BStac mice to model behavioral domains of human mania, including reward-seeking, risk-taking, increased saccharin preference, reduced immobility in the forced swim test (FST), and sensitivity to psychostimulants (Flaisher-Grinberg and Einat, 2010; Hannah-Poquette et al., 2011; Kalinichev and Dawson, 2011). Interestingly, mood stabilizers such as lithium salts and valproate diminished these activities displayed by BStac mice without altering those of BScr mice (Juetten and Einat, 2012). Thus, the activity of BStac mice is highly sensitive to low doses of amphetamine, and its enhancement is prevented by mood stabilizers (Flaisher-Grinberg and Einat, 2010) and GSK3 β inhibitors (Kalinichev and Dawson, 2011; Garzón-Niño et al., 2017). On the other hand, mice with a genetic deletion of histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) also display manic-like behaviors. HINT1^{-/-} mice rapidly switch into depressive-like behaviors in response to stressful situations (Garzón-Niño et al., 2017). In contrast, the elevated manic activity of BStac mice predominates and prevents stress from triggering the mechanisms necessary to reduce mobility in the FST. Because human mania is associated with altered glutamatergic neurotransmission (Ongür et al., 2008; Gao et al., 2013), a valid animal model of mania is expected to exhibit such a relevant molecular feature. In this respect, alterations in the glutamate N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) apparently facilitate the differential responses exhibited by BStac (acute mania/bipolar type I) and HINT1^{-/-} mice (bipolar mania/bipolar type II) in response to stressful paradigms and pharmacological interventions (Garzón-Niño et al., 2017). Thus, the characteristics of BStac and HINT1^{-/-} mice may assist in the detection/development of suitable drugs for treating human mania.

Evidence suggests that sigma receptors type 1 (σ 1Rs) are involved in several neurological and psychiatric conditions (Kourrich et al., 2012), and hence sigma receptor ligands may serve as the next generation of psychotherapeutic drugs (Hayashi and Su, 2004). Because NMDARs are implicated in

mental illnesses such as schizophrenia, depression, and bipolar disorder (Mathews et al., 2012; Naughton et al., 2014; Poels et al., 2014; Deutschenbaur et al., 2016), the capacity of σ 1Rs to modulate NMDAR transmission (Martina et al., 2007) and particularly that of σ 1R antagonists to prevent NMDAR hypofunction (Sánchez-Blázquez et al., 2014) could be useful for designing pharmacological interventions to alleviate the aforementioned mood dysfunctions. The HINT1 protein collaborates with σ 1Rs to bring glutamate NMDARs under control of certain G protein-coupled receptors (GPCRs) (Rodríguez-Muñoz et al., 2015b). In this context, σ 1R antagonism prevents HINT1 proteins from coupling GPCR function to that of NMDARs, thereby controlling the cellular impact of this glutamatergic activity (Rodríguez-Muñoz et al., 2015b). The antagonists of σ 1Rs take advantage of this mechanism, and in inflammatory pain models involving NMDAR activation these drugs effectively diminish pain-related behaviors (Vela et al., 2015). Thus, the present study explores the potential of σ 1R ligands as antimanic/mood stabilizers in BStac and HINT1^{-/-} “manic” mice.

Materials and Methods

Animals and Drugs

Two strains of male BScr and BStac mice were used in this study. Knock-out mice with a 129 genetic background that exhibit targeted disruption of the HINT1 gene (HINT1^{-/-}, a gift from I. B. Weinstein/J. B. Wang) and wild-type littermate mice (HINT1^{+/+}) were also utilized. Male mice were housed at a constant temperature (22 \pm 1°C) under a 12-h-light/-dark cycle and allowed unlimited access to food and water. Experiments were regularly performed in different cohorts of mice to avoid any variations caused by handling stress or exposure to stressful paradigms. Each mouse was used only once. Experiments were performed according to the European regulations for experimental work with animals (directive 2010/63/EU) and were approved by the Ethical Committee for Research at CSIC (SAF2012-34991 and CAM PROEX 225/14).

The σ 1R antagonist S1RA: 4-[2-[[5-methyl-1-(2-naphthalenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxy]ethyl] morpholine) was obtained from Cayman Chemical USA (# 16279); TDZD8 (#T8325) and valproic acid sodium salt (#P4543) were purchased from Sigma Aldrich. BD1047 (#0956), BD1063 (#0883), PD144418 (#2606), (\pm)-PPCC oxalate (#3870), PRE084 (#0589), amphetamine (# 2813), and MK801 (#0924) were obtained from Tocris Bioscience. Test drugs were dissolved in saline except PPCC, PD144418, and TDZD8, which were prepared in 1:1:18 (v/v/v) mixture of ethanol:Kolliphor EL (Sigma, C5135):physiological saline. To facilitate a selective and direct access to their targets, the compounds were each injected into the lateral ventricles of mice at 4- μ L volume as previously described (Rodríguez-Muñoz et al., 2012; Garzón et al., 2015). Animals were lightly anesthetized and intracerebroventricular (icv) injections were performed with a 10- μ L Hamilton syringe at a depth of 3 mm at a point of 2 mm lateral and 2 mm caudal

from the bregma. The 4 μ L were infused at a rate of 1 μ L every 5 seconds. After that, the needle was maintained for an additional 10 seconds. The administration of amphetamine and valproate was by the i.p. route. Groups of 6 to 10 mice were treated with the selected compounds.

Behavioral Testing

Before beginning behavioral testing, the mice were allowed to acclimate to the testing room for 2 consecutive days (60 min/d). On the third day (testing), these animals were transferred to the testing room 30 minutes prior to each test session. To exclude potential changes in behavior, each test was performed with a different cohort of animals. Drug doses were selected based on previous works (Vela et al., 2015; Garzón-Niño et al., 2017). Vehicle control animals received equivalent volumes of saline. The icv administration did not alter the behavioral assessment of the mice, since the injection of saline did not modify their performance in the tests.

Spontaneous Activity

Mice were tested individually for spontaneous activity using 20 \times 20 \times 28-cm transparent plastic automated activity monitors (Accuscan activity analyzer, Versamax 260 v2.4; Omnitech Electronics, Inc.). Infrared beam crossings were recorded for 90 minutes at 10-minute intervals. At the end of the session, mice were returned to their home cages, and the boxes were wiped clean with a 10% alcohol solution.

Response to Psychostimulants

We tested separate cohorts of BStac and BScr mice to evaluate the hyperlocomotor-inducing effects of psychostimulants. Mice were allowed a 30-minute habituation period, injected with amphetamine (2 mg/kg, i.p.), and returned to their activity cages. Additionally, the horizontal activities of mice pretreated with either the selective GSK3 β inhibitor TDZD-8 (20 nmol per mouse, icv) or sigma ligands (3 nmol, icv) were also recorded. The effects of genotype on drug-induced increases in the total distance travelled (calculated by the pre-drug distance travelled subtracted from the post-drug distance travelled) were analyzed by comparing them with those of the control group.

Sweet Solution Preference Test

Over a period of 48 hours, mice were given the option of consuming a 1% sucrose solution (Sigma Aldrich) in addition to their regular supply of water and food. The bottle containing the sweet solution was made available to the mice throughout the entire preference test period. Sucrose solution and water bottle weights were recorded at the beginning of the experiment and every 24 hours thereafter. To avoid the possible effect of a side preference on drinking behavior, the positions of the bottles were changed every 12 hours. Mice were not subjected to food or water deprivation prior to the test. Drugs were administered twice a day; drug administration started 1 day before the sweet solution consumption testing began and continued throughout the 2 days of the experiment. Vehicle control groups received an equivalent volume of saline. Preference for sucrose was calculated as the percentage of sucrose solution consumed relative to the total amount of liquid consumed.

Forced Swim Test

This test was based on the original version of the Porsolt forced swim test for mice (Porsolt et al., 1977). Mice were placed in a 5-L cylinder (40 cm high, 25 cm diameter) filled with 3.5 L of water

and swam without the ability to touch the bottom. Mice were placed in water for 6 minutes, and the last 4 minutes of the session were manually scored for total time of activity (swimming, defined as correlated movements of all 4 limbs, and struggling, defined as intensive movements of all paws, mostly against the container wall) vs immobility (floating with only minimal movements needed to keep their heads above water).

Membrane Preparation and Protein Detection

Briefly, frontal cortex synaptosomal membranes were obtained from groups of 6 to 10 mice that were killed via decapitation after receiving the drugs being investigated. Cerebral cortices were homogenized in 10 volumes of 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 0.32 M sucrose supplemented with a phosphatase inhibitor mixture (P2850; Sigma Aldrich), H89 (B1427; Sigma Aldrich), and a protease inhibitor cocktail (P8340; Sigma Aldrich). The homogenate was centrifuged at 1000 g for 10 minutes to remove the nuclear fraction. The supernatant (S1) was centrifuged twice at 20000 g for 20 minutes to obtain the crude synaptosomal pellet (P2). The final pellet was diluted in Tris buffer supplemented with a mixture of protease inhibitors (0.2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 2 μ g/mL leupeptin, and 0.5 μ g/mL aprotinin) then divided into aliquots and processed for protein determinations. Proteins were resolved by SDS/PAGE, transferred onto 0.2 μ m polyvinylidene difluoride membranes (162-0176; Bio-Rad), and probed overnight at 6°C with the selected primary antibodies diluted in Tris-buffered saline pH 7.7 +0.05% Tween 20. Those were detected using secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase. The western-blot images, antibody binding, were visualized by chemiluminescence (#170-5061; Bio-Rad) and recorded using a ChemImager IS-5500 (Alpha Innotech). Protein immunosignals, and those of α -tubulin, were measured using the area of the strongest signal of each studied group of samples (average optical density of the pixels within the object area/mm²; AlphaEase FC software), and the grey values of the means were then normalized within the 8 bit/256 grey levels [(256-computed value)/computed value]. Equal loading was verified and adjusted, if necessary, vs α -tubulin. Immunosignals were computed relative to those of controls that were attributed an arbitrary value of 1.

Antibodies

The following primary antibodies were used in this study: anti-NR1 (#MAB1586 Millipore), anti-NR1C1 (#AB5046P Millipore), anti-NR2A (#ab14596 Abcam), anti-NR2B (#ab14400 Abcam), anti-NR1 C1 P-S897 (#ABN99 Millipore), anti-NR2B P-Y1472 (#AB5403 Millipore), anti-NR2B P-Y1303 (#ab81271 Abcam), anti-NR2B P-Y1480 (#PA1-4733 ThermoFisher Scientific), anti NR2B P-Y1252 (#ab18532 Abcam), anti-GSK3 β (#9315 Cell Signaling Technology), anti-P-S9 GSK3 β (#9336 Cell Signaling Technology), anti-P-Y216 GSK3 β (#ab75745 Abcam), anti-Akt (#4691 Cell Signaling Technology), anti-P-S473 Akt (#4060 Cell Signaling Technology), anti-P-T308 Akt (#2965 Cell Signaling Technology), anti-PKC sampler kit (#611421 BD Biosciences), anti-PKC γ (#ab71558 Abcam), and anti- α tubulin (#T9026 Sigma Aldrich).

Statistical Analyses

Graphs were generated using Sigmaplot v.13 (SPSS Science Software). Statistical analyses were performed using IBM Statistics SPSS 24. Data for the amphetamine-induced hyperactivity test and sweet solution preference (preference ratio)

were analyzed using 2-way ANOVA with genotype and treatment as main factors. Data for FST (immobility time) were analyzed using 3-way ANOVA with genotype, MK801/saline, and treatment as main factors. Experiments performed across multiple days were analyzed using a repeated-measures ANOVA. All experiments produced a significant interaction; thus, the follow-up analysis involved 1-way ANOVAs for each genotype and MK801/saline treatment followed by all pairwise Holm-Sidak multiple comparison test as indicated in the legends to the figures. Data for protein expression were analyzed using 1-way ANOVA followed by Holm-Sidak test. Statistical significance was defined as $P < .05$.

Results

Mood-Stabilizing Property of Sigma 1 Receptor Antagonists

As a control in studies with BStac mice, we compared their behavioral phenotype with that of BScr mice. BStac mice exhibited a higher locomotor activity [$F(1,10)=15.45$, $t=3.93$ $P=.003$

and sweet solution preference [$F(8,45)=49.24$ $P<.001$; $t=5.88$ $P<.001$] than BScr mice (Figure 1A, B). As aforementioned, human antimania drugs did not alter amphetamine-induced hyperactivity [$F(8,45)=26.23$ $P<.001$; TDZD-8 $t=0.99$ $P=.94$] or sucrose preference in BScr mice [$F(8,45)=49.24$ $P<.001$; valproate $t=0.23$ $P=.96$]; however, these behaviors were significantly diminished by these mood stabilizers in BStac mice (TDZD-8 $t=10.19$, $P<.001$ and valproate $t=14.01$, $P<.001$). As observed for mood stabilizers, administration of the $\sigma 1R$ antagonist S1RA did not alter these behaviors in BScr mice; however, S1RA and other $\sigma 1R$ antagonists such as BD1047 and BD1063 but not the agonist PRE084 attenuated the manic-like behaviors displayed by BStac mice in these paradigms [amphetamine-induced hyperactivity: $F(8,45)=26.23$, $P<.001$; S1RA $t=10.57$, $P<.001$; BD1047 $t=5.49$, $P<.001$; BD1063 $t=6.24$, $P<.001$; sucrose preference: $F(8,45)=49.24$, $P<.001$; S1RA $t=15.07$, $P<.001$; BD1047 $t=9.89$, $P<.001$; BD1063 $t=8.65$, $P<.001$]. These results indicate that BStac mice exhibit manic-like behaviors and that BScr mice are suitable for use as their controls.

BStac mice exhibited much higher swim activity than BScr mice in the FST [$F(1,17)=536.44$, $t=23.16$ $P<.001$]. Then, we

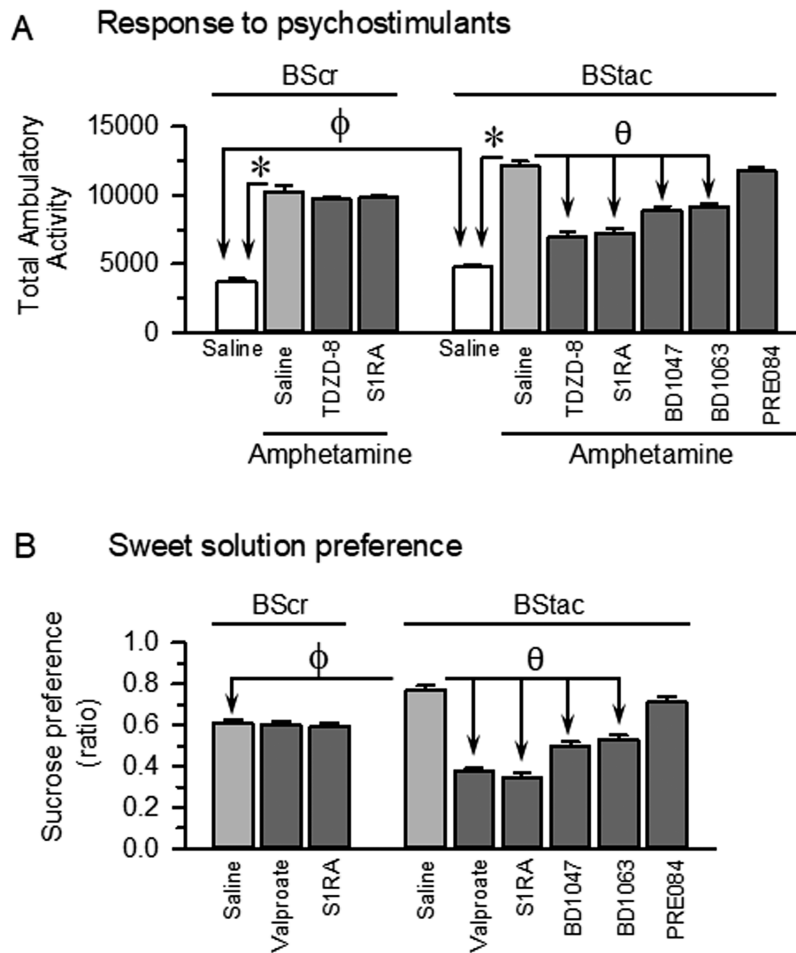


Figure 1. Black Swiss (BS) mice exhibit manic-like behaviors: effect of $\sigma 1R$ ligands and mood stabilizers. (A) Hyperactivity evoked by acute systemic amphetamine administration (hypersensitivity to psychostimulants). Horizontal activity of BScr (BS Charles River) and BStac (BS Taconic Farms) mice pretreated (i.p., at time 0) with vehicle (saline), TDZD-8 (20 nmol, icv), or $\sigma 1R$ ligands (3 nmol, icv). After 30 minutes of activity, the mice received saline or amphetamine (2 mg/kg, i.p.) and were observed during the subsequent 70-minute period. (B) Sweet solution preference ratios (hedonistic drive) on days 1 and 2 of the test. Each assay was performed on different cohorts of mice. Preference ratio was calculated as the percentage of sucrose solution consumed relative to the total amount of liquid consumed. Compounds were administered twice a day either via systemic i.p. injections (valproate, 200 mg/kg) or icv injections ($\sigma 1R$ ligands, 3 nmol). Each bar is the computed mean \pm SEM of the groups, $n=6$. ϕ In the absence of drugs (saline), the behavior of the BS strains was significantly different; *significantly different compared to the BS control group, which received saline instead of amphetamine. Within amphetamine-treated BS mice, θ indicates a significant difference from the group that received saline instead of the drug under study. ANOVA, Holm-Sidak multiple comparisons, $P < .05$. See further details in "Methods."

addressed the influence of the mood stabilizers valproate and TDZD-8 and of σ 1R antagonists on the activity of these BS mice in this paradigm (Figure 2A). With the exception of TDZD-8, which moderately increased BScr swim activity [F(13,126)=196.50, $P < .001$; TDZD-8 $t = 6.81$, $P < .001$], these drugs did not significantly alter this behavior in BScr mice; however, they clearly diminished swim activity in BStac mice [F(13,112)=127.40, $P < .001$].

The NMDAR mediates pro-depressive (antiactivity) behaviors in the FST, and as reported (Garzón-Niño et al., 2017) the NMDAR antagonist MK801 increased swim activity in BScr mice that received only saline [F(13,126)=196.50, $P < .001$; MK801 $t = 20.45$, $P < .001$] but failed to do so in saline-treated “manic” BStac mice [F(13,112)=127.40, $P < .001$; MK801 $t = 2.54$, $P = 0.20$]. In MK801-injected BScr mice, TDZD-8 and valproate produced a significant

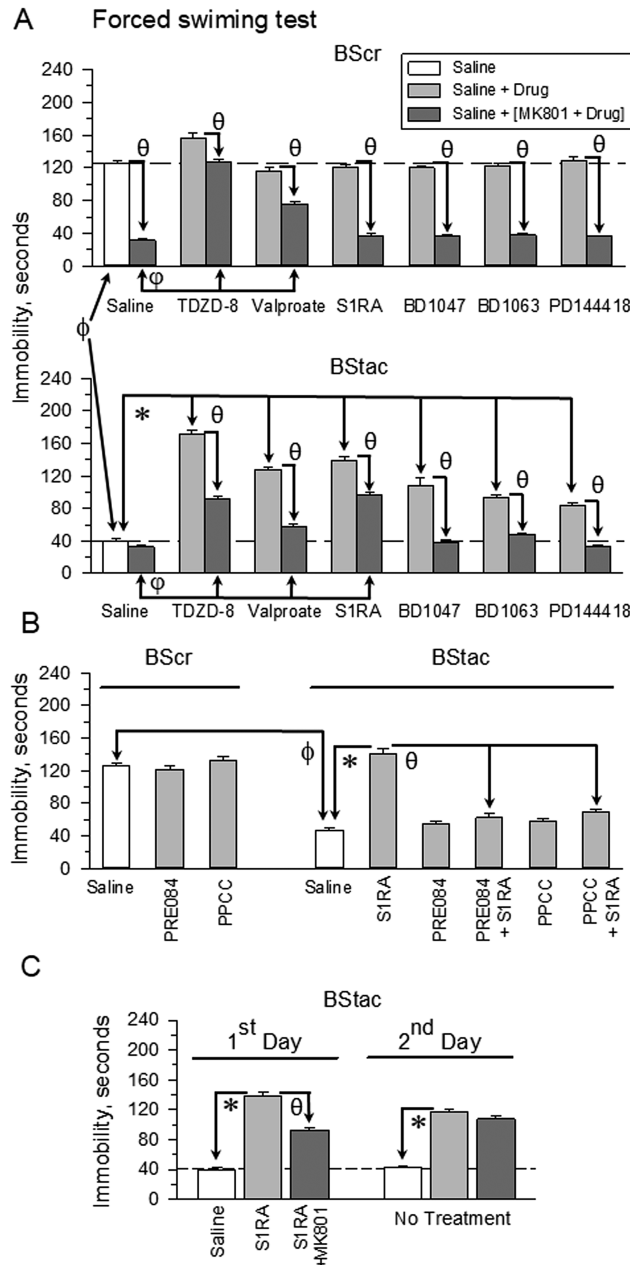


Figure 2. Effect of σ 1R ligands on the activity of (Black Swiss [BS] Charles River) and BS Taconic Farms (BStac) mice in the forced swim test (FST). (A) Compounds were acutely administered either systemic i.p. injections (valproate, 200 mg/kg, 60 minutes prior the FST) or icv injections (TDZD-8, 20 nmol; σ 1R ligands, 3 nmol, 30 minutes prior the test). These doses did not significantly affect spontaneous mouse activity. ϕ Indicates that in the absence of drugs (saline), the BS strains significantly differed in their swim activity in the FST; *within BStac mice, significant difference from the group receiving saline instead of the drug under study. The NMDAR antagonist, MK801 (light grey bars), was given in an icv injection at 1 nmol 30 minutes before the FST. θ Significant difference compared to the control group that received saline or the drugs. Within MK801-treated mice, ϕ indicates a significant difference compared to the control group that received saline instead of the drug. (B) The σ 1R agonists, PRE084 or PPCC, reduced the normalizing effect of S1RA in “manic” BStac mice. ϕ As above; *significantly different from the group that received saline instead of S1RA; θ significantly different from the group that received only S1RA. (C) The antimanic effect of a single icv injection of S1RA persisted for at least 24 hours. BStac mice received S1RA \pm MK801 and were tested in the FST. After 24 hours, the same mice were subjected to a second FST without additional pharmacological treatment. *Significantly different from the control group that received saline instead of S1RA on day 1. Within BStac mice treated on day 1 with S1RA, θ indicates a significant difference from the group that also received MK801 on day 1. (A–C) Each bar represents the mean \pm SEM of the data obtained from 7 to 10 mice. ANOVA, Holm-Sidak multiple comparisons, $P < .05$.

reduction in the NMDAR-mediated component of their swim behavior [$F(13,126)=196.50$, $P<.001$, TDZD-8 $t=20.97$, $P<.001$; valproate $t=9.68$, $P<.001$] (Figure 2A). In contrast, $\sigma 1R$ antagonists did not produce such an alteration, and in their presence the NMDAR antagonist MK801 retained its full capacity to increase BScr swim activity. Notably, in BStac mice, these drugs facilitated the expression of the NMDAR-mediated component during the FST (Figure 2A). After the mood stabilizers and the $\sigma 1R$ antagonists diminished the swim activity of BStac mice, MK801 was able to significantly increase their activity in the FST [$F(13,112)=127.40$, $P<.001$]. In the presence of MK801, the activity of BStac mice treated with BD1047, BD1063, or PD144418 did not differ from that of saline-treated BStac mice. The activity of MK801-treated mice when TDZD-8, S1RA, and valproate were the drugs co-administered was lesser than that of saline-treated BStac mice [$F(13,112)=127.40$, $P<.001$; TDZD-8 $t=11.96$, $P<.001$; S1RA $t=12.84$, $P<.001$; valproate $t=5.88$, $P<.001$]. The agonists of $\sigma 1R$ s, PRE084, and PPCC did not alter swim activity in control BScr [$F(8,53)=56.19$, $P<.001$; PRE084 $t=1.00$, $P=.91$; PPCC $t=1.73$, $P=.56$] or “manic” BStac mice [$F(8,53)=56.19$, $P<.001$; PRE084 $t=0.76$, $P=.90$; PPCC $t=0.43$, $P=.88$] in the FST; however, these $\sigma 1R$ agonists diminished the antimanic activity exhibited with S1RA treatment in BStac mice [PRE084 $t=11.73$, $P<.001$; PPCC $t=10.43$, $P<.001$] (Figure 2B). The antimanic effect of a single administration of S1RA to BStac mice persisted at least for 24 hours [$F(5,48)=124.11$, $P<.001$; 1st day $t=19.4$, $P<.001$; 2nd day $t=14.24$, $P<.001$] (Figure 2C). At this time point, the MK801-sensitive anti-activity component of S1RA-treated mice on day 1 was reduced, suggesting that the $\sigma 1R$ antagonist primarily diminishes hyperactivity in these mice by reducing proactivity behaviors.

To further substantiate the profile of $\sigma 1R$ antagonists as mood stabilizers, we tested their effects in another animal model of mania, the “bipolar” HINT1^{-/-} mice (Garzón-Niño et al., 2017), which compared to HINT1^{+/+} wild-type littermates exhibit increased activity in the FST [$F(11,78)=122.99$; $t=17.53$, $P<.001$] (Figure 3A). As observed in BStac mice, the GSK3 β inhibitor TDZD-8 and $\sigma 1R$ antagonists but not agonists significantly decreased swimming activity in HINT1^{-/-} mice [$F(11,78)=122.99$, $P<.001$; TDZD-8 $t=10.92$, $P<.001$; BD1047 $t=14.92$, $P<.001$; BD1063 $t=17.33$, $P<.001$] without altering that in HINT1^{+/+} controls (Figure 3A). HINT1^{+/+} mice and, to a minor extent, HINT1^{-/-} mice exhibit MK801-sensitive, prodepressive behaviors in the FST. This observation suggests that HINT1^{-/-} mice exhibit manic-like behaviors but of lower intensity than those in BStac mice (Garzón-Niño et al., 2017). In the present study, administration of S1RA did not alter the enhancing effect of MK801 on the swim behavior exhibited by HINT1^{+/+} mice [$F(15,100)=111.82$, $P<.001$; S1RA $t=2.6$, $P=.20$]. However, MK801 produced a lower level of swim stimulation when HINT1^{-/-} mice had received S1RA [$F(15,100)=111.82$, $P<.001$; S1RA $t=10.14$, $P<.001$]. In both groups of HINT1 mice, TDZD-8 and valproate weakened the stimulatory swim effects of MK801 [HINT1^{+/+} mice: TDZD-8 $t=4.73$, $P<.001$; valproate $t=4.77$, $P<.001$; HINT1^{-/-} mice: TDZD-8 $t=15.50$, $P<.001$; valproate $t=14.06$, $P<.001$] (Figure 3A). The “bipolar” HINT1^{-/-} mice exhibit manic-like behaviors prior to exposure to stressful paradigms, and after being challenged, they progressively develop depression-like behaviors, that is, decreased activity time in the FST (Garzón-Niño et al., 2017). This particular feature of these bipolar mice was confirmed in the present study [$F(7,64)=136.86$, $P<.001$; HINT1^{-/-} mice, stress-induced transit $t=16.82$, $P<.001$] (Figure 3B). As aforementioned, S1RA diminished the activating effect of MK801 on the swim behavior of HINT1^{-/-} mice, and this reduction was also observed 24 hours later during the second FST, which was performed in the absence of further treatment

(Figure 3B). This normalizing effect of S1RA was not observed if the HINT1^{-/-} mice had already switched into the depressive-like state. Interestingly, the stimulatory effect of MK801 on the swim behavior of the mice is also produced by drugs with antidepressant activity in humans (Garzón-Niño et al., 2017). Thus, S1RA and probably other $\sigma 1R$ antagonists selectively act as antimanic drugs but not as antidepressants.

BStac Mice Display Altered Akt/GSK3 β Signaling

Our previous work revealed that “manic-depressive bipolar” HINT1^{-/-} mice present a series of molecular changes, such as increased PKC, PKA, and GSK3 β activity and altered glutamate NMDAR composition and function (Garzón-Niño et al., 2017). Thus, we evaluated possible alterations in the Akt/GSK3 β pathway and their regulatory phosphorylation in BStac and BScr mice (Figure 4). In the frontal cortex, the total levels of Akt and GSK3 β did not significantly differ between the 2 groups of BS mice. However, phosphorylation analysis revealed marked differences between these mice. Compared to the phosphorylation status of GSK3 β in BScr mice, Akt-mediated inhibitory phosphorylation of GSK3 β at serine 9 (P-S9) was higher in BStac mice. Analysis of the activating phosphorylation of GSK3 β at tyrosine 216 (Y216) revealed that BStac mice exhibited much higher levels of P-Y216 GSK3 β than BScr mice. Manic-like behaviors are usually associated with high GSK3 β activity. In BStac mice, activating P-Y216 was likely more predominant than the inhibitory P-S9, and consequently, the resulting GSK3 β activity may have been higher than that in BScr mice. This result could explain the rapid cessation of manic-like behavior after GSK3 β pharmacological inhibition by TDZD-8 (Figures 1 and 2).

The administration of TDZD-8 to BStac mice reduced GSK3 β activity by increasing levels of P-S9 GSK3 β without altering those of P-Y216 GSK3 β (Figure 5A). This effect was not reproduced by sigma ligands. However, in these “manic” mice TDZD-8 did not alter NMDAR-related parameters such as the presence of NR1 subunits carrying the C1 cytosolic segment, which enables GPCR-NMDAR cross-regulation (Rojas and Dingledine, 2013), or the levels of calcium and calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) and its activating auto-phosphorylation on T286. In contrast, the selective $\sigma 1R$ antagonist S1RA increased NR1 C1 levels, and although it did not modify CaMKII levels, S1RA decreased the extent of P-T286 CaMKII, effects not observed with the administration of the $\sigma 1R$ agonist PRE084 (Figure 5B). Thus, although administration of S1RA and TDZD-8 to “manic” BStac mice led to a similar antimanic profile, their effects were likely achieved through a different molecular mechanism. Our data suggest that $\sigma 1R$ antagonists, such as S1RA and BD1063, produce mood stabilization by also acting at the NMDAR level.

Discussion

BStac and HINT1^{-/-} mice when compared to their corresponding controls, BScr and HINT1^{+/+} mice, exhibit higher swim activity in the FST, an increased sensitivity to psychostimulants, and augmented aggressive and reward-seeking behaviors. These differential features are proposed to reflect the increased vigor and goal-directed behaviors that characterize the human mania (Flaisher-Grinberg and Einat, 2010; Garzón-Niño et al., 2017). To avoid possible differences in bioavailability after crossing the BBB, we administered the $\sigma 1R$ ligands by icv route at equimolar concentrations, similar to those found effective in mu-opioid-induced analgesia regulation (Sánchez-Blázquez et al., 2014; Rodríguez-Muñoz et al., 2015b). Interestingly, the present study

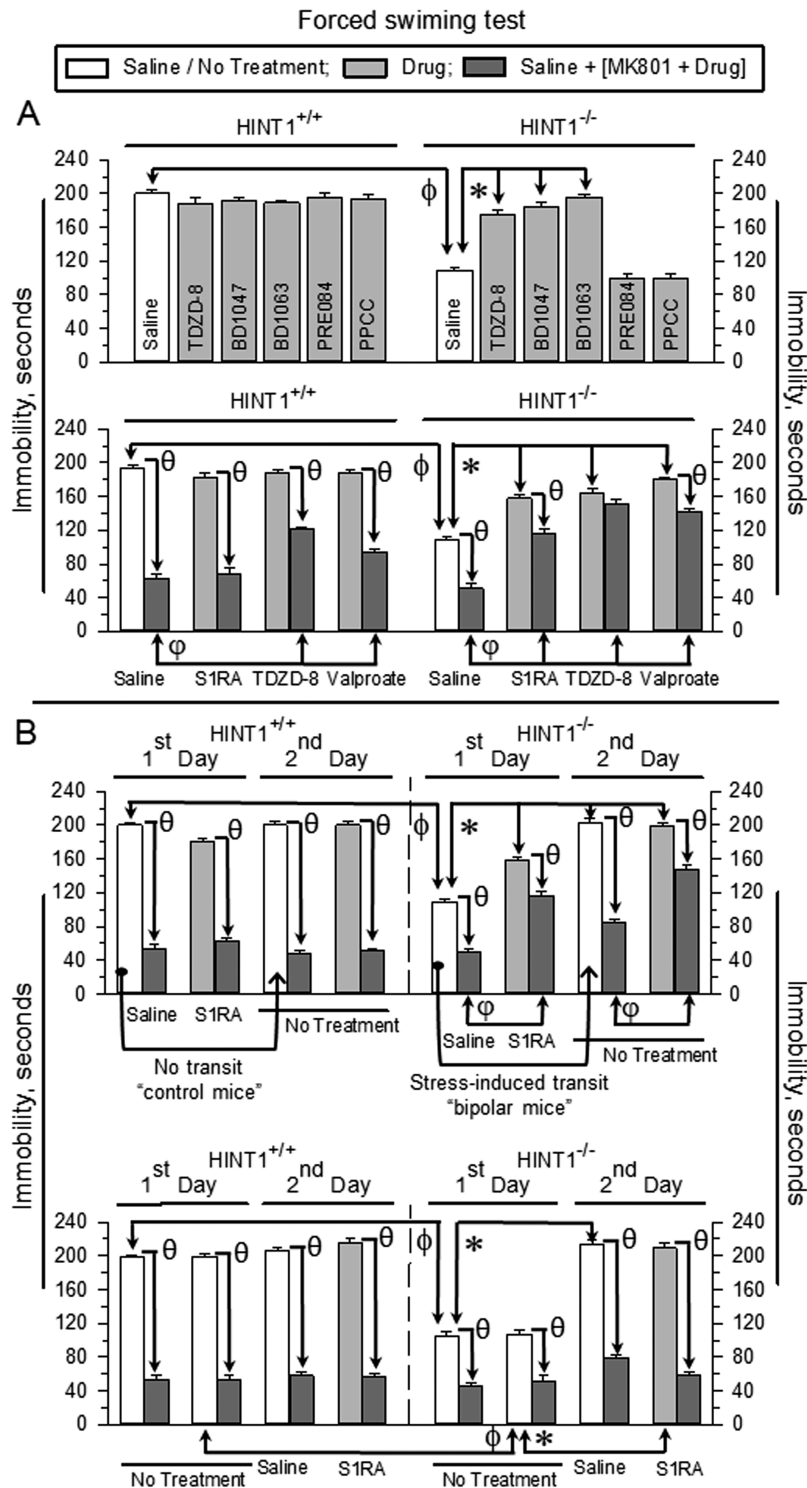


Figure 3. Effect of σ_1 R ligands on the activity of $HINT1^{+/+}$ and “bipolar” $HINT1^{-/-}$ mice in the FST. (A) Details are the same as in Figure 2. (B) Upper panel: saline or S1RA (3 nmol) was administered via icv injection before the first FST challenge. After 24 hours, the same animals were tested in the FST a second time. The arrows indicate that $HINT1^{-/-}$ “manic” mice but not their controls littermates exposed to the stressful FST on day 1 exhibited a depression-like and MK801-sensitive behavior during the second FST (Garzón-Niño et al., 2017). ϕ Significantly different from the activity of wild type mice in the FST; *significantly different from the control group that received saline on the 1st day. θ Significantly different from the corresponding group that did not receive MK801; ϕ significantly different from the group that received MK801 on the 1st day. Lower panel: on the first day, the mice received no treatment before the FST; 24 hours later, they were given an icv injection of saline or S1RA and reexposed to the FST. ϕ Significantly different from the activity of wild type mice in the FST; *significantly different from the control group that received no treatment on the 1st day; θ significantly different from the corresponding group that did not receive MK801. Each bar represents the mean \pm SEM of data obtained from 7 to 10 mice. ANOVA, Holm-Sidak multiple comparisons, $P < .05$.

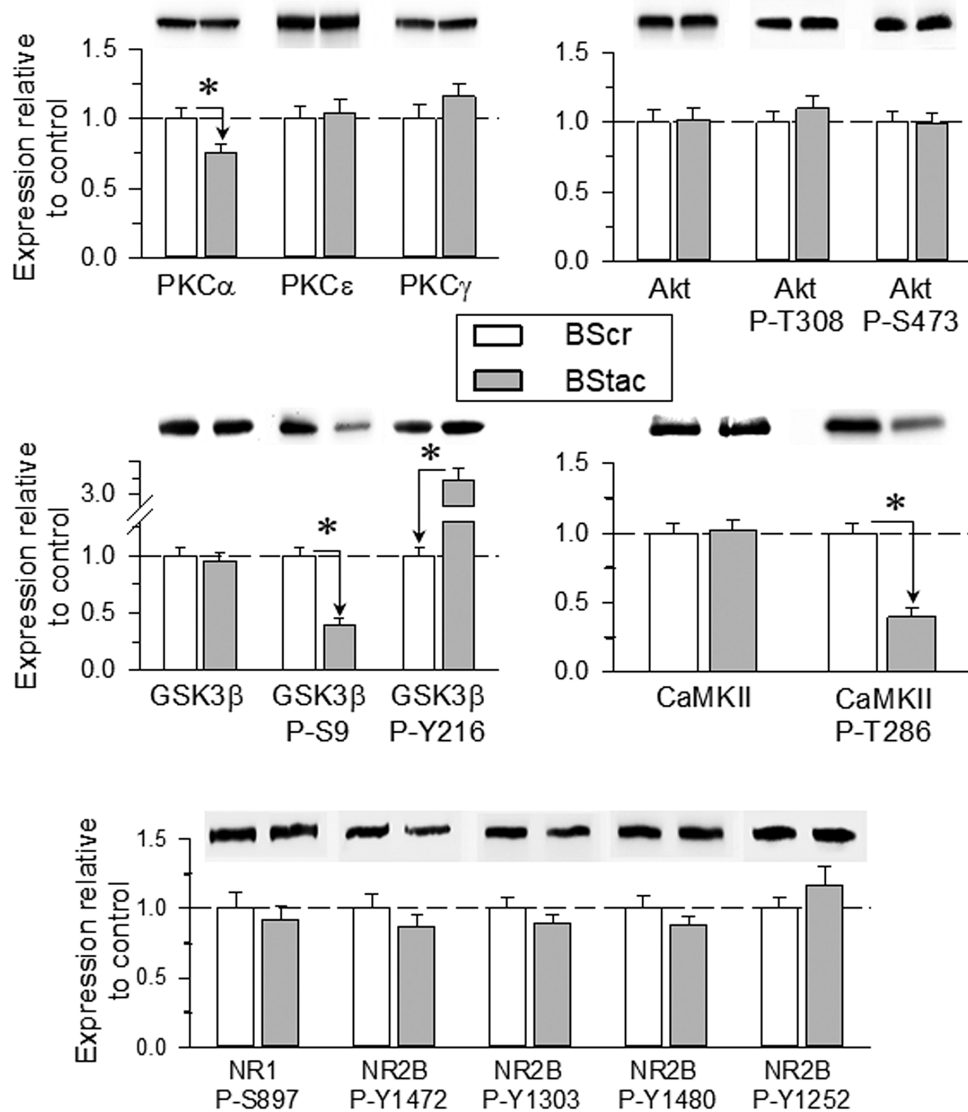


Figure 4. PKC, Akt/GSK3 β , and N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)/ calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) signaling pathways in Black Swiss (BS) mice. Total levels and phosphorylated forms of the proteins were determined by SDS-PAGE/western-blot analysis in frontal cortical tissue obtained from BS Taconic Farms (BStac) and BS Charles River (BScr) mice. The immunosignal corresponding to the BScr control was assigned an arbitrary value of 1. The assay was repeated thrice on samples from different mice that were not previously subjected to behavioral testing. *Significantly different from the BScr control group with ANOVA, Holm-Sidak multiple comparisons, $P < .05$. Representative blots are shown.

showed that σ 1R antagonists such as S1RA, BD1047, BD1063, and PD144418 normalized the conduct of “manic” BStac and HINT1 $^{-/-}$ mice without altering that of BScr and HINT1 $^{+/+}$ mice. The σ 1R antagonist S1RA was more efficacious at counteracting the manic-like behaviors than the other antagonists evaluated. This finding corroborates previous data showing that S1RA is the most effective antagonist in an in vivo experimental model evaluating the agonist/antagonist performance of σ 1R ligands (Sánchez-Blázquez et al., 2014). The antimanic effects promoted by σ 1R antagonists were reduced by σ 1R agonists, thus indicating the participation of σ 1Rs in the control of the mood exhibited by HINT1 $^{-/-}$ and BStac mice.

The glutamatergic system, particularly the NMDAR, plays a critical role in the setting of normal behavior, probably via control of antiactivity processes (Garzón-Niño et al., 2017). Thus, the downregulation of this glutamatergic function facilitates the expression of mania-like behaviors (Szabo et al., 2009), which

are apparently related to abnormal increases in GSK3 β activity (Polter et al., 2010), and accordingly, inhibitors of this enzyme diminish the expression of these conducts (O’Brien et al., 2004). NMDARs together with GSK3 β determine the synaptic tone and, thus, the quality of neuronal communication (Zhu et al., 2007). On the other hand, NMDAR activity is regulated by different GPCRs, some of which enhance this glutamatergic signaling via PKC and nonreceptor tyrosine kinases such as Src (Rojas and Dingledine, 2013). The increased activity of PKC in the prefrontal cortex may also account for the symptoms of mania, and in fact, lithium, a major treatment for mania, diminishes PKC signaling cascade in which GSK3 β is also implicated (Sourial-Bassillious et al., 2009; Szabo et al., 2009; Garzón-Niño et al., 2017). Thus, mania-like behaviors can be induced by increasing proactivity moods, which may occur after increasing PKC/GSK3 β activity in cortical areas. However, mania-like behaviors can also appear after a reduction in NMDAR-mediated antiactivity processes

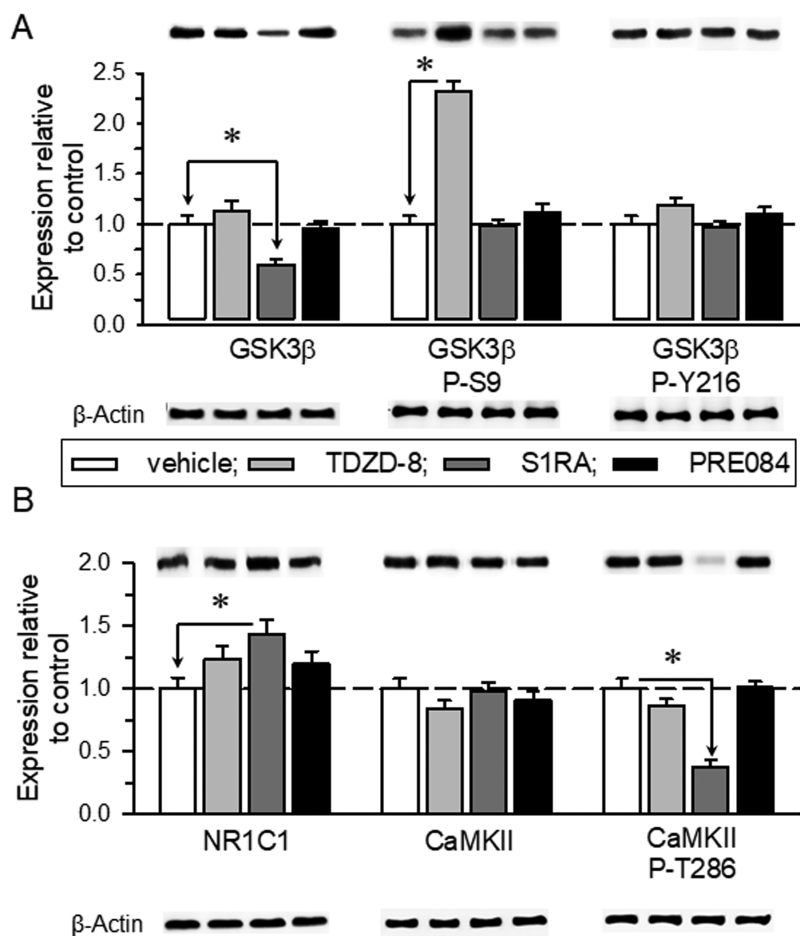


Figure 5. Effect of TDZD-8, S1RA, and PRE084 on the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)/ calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) pathway of Black Swiss Taconic Farms (BStac) mice. (A–B) Effect of TDZD-8 (20 nmol, icv), S1RA (3 nmol, icv), and PRE084 (3 nmol, icv) on BStac frontal cortical levels of GSK3 β , NMDAR NR1 C1, and CaMKII. The mice were killed 30 minutes after the last drug/saline administration. The immunosignal corresponding to the BStac control was assigned an arbitrary value of 1. The assay was repeated thrice on samples from different mice, which were not previously subjected to behavioral testing. *Significantly different from the control group. ANOVA, Holm-Sidak multiple comparisons, $P < .05$. Representative blots are shown.

(Garzón-Niño et al., 2017). In that sense, NMDAR antagonism causes transient mood elevation or euphoria and psychotomimetic effects similar to a manic-like syndrome (Lu et al., 2016).

Our study further substantiates the efficacy of GSK3 β inhibitors in the reduction of manic-like behaviors in HINT1 $^{-/-}$ and BStac mice. Mood stabilizers, such as valproate and lithium salts, are effective in treating bipolar mania, probably because they indirectly inhibit PKC signaling and consequently diminish GSK3 β function (Zarate and Manji, 2009). Our results suggest that valproate and GSK3 β inhibitors exert antimanic effects by reducing proactivity behaviors without facilitating expression of antiactivity (prodepressive) episodes, which are more related to the function of NMDARs. We have reported that administration of the NMDAR antagonist MK801 to BStac mice does not significantly increase their “manic-like” behavior, which suggests that their intrinsic impulsive (proactivity) behavior restrains the development or expression of NMDAR-mediated anti-activity behavior during the FST (Garzón-Niño et al., 2017). In “bipolar” HINT1 $^{-/-}$ mice, administration of MK801 still increased their activity to levels that approached those exhibited by “manic” BStac mice.

GSK3 β inhibitors and σ 1R antagonists reduced the hyperactivity of both strains of “manic” mice, normalizing their swim behavior in the FST. Notably, MK801 revealed certain differences

in the ways in which these drugs both achieved the control of manic-like behaviors. Whereas MK801 dampened the antimanic effects of valproate, BD1047, BD1063, PD144418, S1RA, and TDZD-8 in BStac mice, the NMDAR antagonist was less effective at counteracting the effects of S1RA, TDZD-8, and valproate in HINT1 $^{-/-}$ mice. Thus, BStac and HINT1 $^{-/-}$ mice may differ in the types of human mania modeled, such as bipolar type I and II, respectively. The inhibition of GSK3 β mostly reduced the expression of proactivity (promanic) behaviors without increasing that of NMDAR-mediated antiactivity (prodepressive) behaviors. In BStac mice, GSK3 β inhibition decreased the expression of proactivity behaviors but also promoted NMDAR-mediated antiactivity behaviors, probably as an indirect effect of GSK3 β inhibition in these “manic” mice. Antiactivity processes may have been restrained by GSK3 β -mediated promanic mechanisms that are free to develop upon GSK3 β inhibition. The HINT1 $^{-/-}$ mice exhibit manic-like behaviors of lower intensity than these of BStac mice, and then, when proactivity behaviors were reduced, prodepressive behaviors barely develop (Garzón-Niño et al., 2017). In both strains of “manic” mice, S1RA reduced proactivity behaviors and apparently promoted NMDAR-mediated antiactivity behaviors; however, after 24 hours the “normalized” behaviors of these mice were mostly accompanied by a discrete MK801-sensitive component. Thus, in “manic” mice, inhibition of

proactivity behaviors releases the restrained NMDAR-mediated antiactivity behaviors; however, under the beneficial effects of the antimanic drugs these prodepressive behaviors diminish to adapt their influence to that of the actual proactivity behaviors.

As mentioned previously, the NMDAR receptor participates in the expression of behaviors that oppose activity, and thus these behaviors are less evident in the manic-like mice (Garzón-Niño et al., 2017). We have reported that expression of NMDAR NR1 subunits is similar in cortical synaptosomes of HINT1^{-/-} and HINT1^{+/+} wild type mice, while expression of the NR1 subtype that carries the C1 cytosolic segment able to couple to GPCRs is 2-fold higher in HINT1^{-/-} mice. Additionally, the levels of NR2A subunits are comparable in these 2 groups of mice, but the NR2B subunit levels are higher in HINT1^{-/-} than HINT1^{+/+} in mice. Differences in NMDAR subunit levels are not observed in BS mouse strains (Garzón-Niño et al., 2017), suggesting that subunit changes are not directly related to mania but mostly facilitate the transition from mania to depression that stressful situations promote in the “bipolar” HINT1^{-/-} mice. Even though BStac and HINT1^{-/-} mice exhibit manic-like behaviors, the 2 strains differ in the cortical content of phosphorylated and nonphosphorylated forms of GSK3 β . These differences may be reconciled in both strains of mice if the activating phosphorylation at Y216 is more predominant than the inhibitory P-S9, thus likely resulting in higher GSK3 β activity in BStac and HINT1^{-/-} mice than in their respective control mice (Garzón-Niño et al., 2017). Accordingly, the antimanic effects of the GSK3 β inhibitor TDZD-8 in BStac mice correlated with increased expression of inhibitory P-S9 GSK3 β without alterations in P-Y216 GSK3 β expression.

Interestingly, S1RA promoted antimanic effects in these mice without significantly modifying GSK3 β total levels or its phosphorylated forms. Instead, the selective σ 1R antagonist increased the presence of glutamate NMDAR NR1 C1 subunits at the plasma membrane. The antagonism of σ 1Rs promotes the physical and functional uncoupling of certain GPCRs from NMDAR function (Rodríguez-Muñoz et al., 2015a). Thus, the rapid increase of NR1 C1 levels observed in BStac mice after S1RA treatment may be a consequence of a reduced co-internalization of NR1 C1 subunits with GPCRs. This possibility has been documented for the cannabinoid CB1Rs, which exert an inhibitory influence on NMDAR function (Sánchez-Blázquez et al., 2013); their co-internalization with NR1 C1 subunits can be disrupted by σ 1R antagonists (Sánchez-Blázquez et al., 2014). Notably, by reducing the influence of activating GPCRs on NMDAR function, σ 1R antagonists reduce allodynia and neural damage in animal models of neuropathy and stroke, respectively (Rodríguez-Muñoz et al., 2015b; Sánchez-Blázquez et al., 2018). At the molecular level, the σ 1R forms a functional complex with HINT1 to coordinate the activity of certain GPCRs with those of NMDARs (Rodríguez-Muñoz et al., 2015b). In this scenario, GPCR signaling leads to the PKC/Src-mediated phosphorylation of NMDARs and their subsequent activation (Rodríguez-Muñoz et al., 2015a, 2016). The antagonists of σ 1Rs provoke the transfer of HINT1 proteins from activated GPCRs to NMDARs, thereby disrupting the GPCR control of NMDAR function, and increasing inactivation of those already primed by GPCRs.

Certainly, several studies have suggested the potential of σ 1R ligands in the treatment of mental illnesses such as schizophrenia (Hayashi and Su, 2004) and depression (Wang et al., 2007; Fishback et al., 2010). However, to the best of our knowledge, the present study is the first to report that σ 1R antagonists can ameliorate manic-like symptoms in animal models of disease. Most relevantly, while these drugs normalized the mood exhibited by “manic” mice, they did not alter the behavior

of the control mice. This selective profile is not exhibited by antimanic drugs such as inhibitors of GSK3 β activity, which also affect the behavior of control mice. Thus, drugs targeting the σ 1R may offer therapeutic protection against manic-like behavior.

Acknowledgments

We thank Gabriela de Alba and Veronica Merino for their excellent technical assistance. The authors are entirely responsible for the scientific content of the paper. The authors acknowledge the assistance of Springer Nature Editing Service in the preparation of this manuscript.

Funding

The work was supported by Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad “Plan Nacional de Drogas” [grant no. 2014-012] and MINECO Plan Nacional I+D+i [grant no. SAF-2015-65420R].

Statement of Interest

None.

References

- Cassidy F, Forest K, Murry E, Carroll BJ (1998a) A factor analysis of the signs and symptoms of mania. *Arch Gen Psychiatry* 55:27–32.
- Cassidy F, Murry E, Forest K, Carroll BJ (1998b) Signs and symptoms of mania in pure and mixed episodes. *J Affect Disord* 50:187–201.
- Deutschenbaur L, Beck J, Kiyhankhadiv A, Mühlhauser M, Borgwardt S, Walter M, Hasler G, Sollberger D, Lang UE (2016) Role of calcium, glutamate and NMDA in major depression and therapeutic application. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 64:325–333.
- Fishback JA, Robson MJ, Xu YT, Matsumoto RR (2010) Sigma receptors: potential targets for a new class of antidepressant drug. *Pharmacol Ther* 127:271–282.
- Flaisher-Grinberg S, Einat H (2010) Strain-specific battery of tests for domains of mania: effects of valproate, lithium and imipramine. *Front Psychiatry* 1:10.
- Gao Y, Jhaveri M, Lei Z, Chaneb BL, Lingrel J, El-Mallakh RS (2013) Glial-specific gene alterations associated with manic behaviors. *Int J Bipolar Disord* 1:33.
- Garzón J, Herrero-Labrador R, Rodríguez-Muñoz M, Shah R, Vicente-Sánchez A, Wagner CR, Sánchez-Blázquez P (2015) HINT1 protein: a new therapeutic target to enhance opioid antinociception and block mechanical allodynia. *Neuropharmacology* 89:412–423.
- Garzón-Niño J, Rodríguez-Muñoz M, Cortés-Montero E, Sánchez-Blázquez P (2017) Increased PKC activity and altered GSK3B/NMDAR function drive behavior cycling in HINT1-deficient mice: bipolarity or opposing forces. *Sci Rep* 7:43468.
- Grunze H, Vieta E, Goodwin GM, Bowden C, Licht RW, Moller HJ, Kasper S (2009) The World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for the biological treatment of bipolar disorders: update 2009 on the treatment of acute mania. *World J Biol Psychiatry* 10:85–116.
- Gupta SC, Sinha VK, Prahara SK, Gandotra S (2011) Factor structure of manic symptoms in adolescents. *Ann Clin Psychiatry* 23:243–249.

- Hannah-Poquette C, Anderson GW, Flaisher-Grinberg S, Wang J, Meinerding TM, Einat H (2011) Modeling mania: further validation for Black Swiss mice as model animals. *Behav Brain Res* 223:222–226.
- Hayashi T, Su TP (2004) Sigma-1 receptor ligands: potential in the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Drugs* 18:269–284.
- Jope RS, Roh MS (2006) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Curr Drug Targets* 7:1421–1434.
- Juetten J, Einat H (2012) Behavioral differences in black Swiss mice from separate colonies: implications for modeling domains of mania. *Behav Pharmacol* 23:211–214.
- Kalinichev M, Dawson LA (2011) Evidence for antimanic efficacy of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) inhibitors in a strain-specific model of acute mania. *Int J Neuropsychopharmacol* 14:1051–1067.
- Kourrich S, Su TP, Fujimoto M, Bonci A (2012) The sigma-1 receptor: roles in neuronal plasticity and disease. *Trends Neurosci* 35:762–771.
- Lu YY, Lin CH, Lane HY (2016) Mania following ketamine abuse. *Neuropsychiatr Dis Treat* 12:237–239.
- Manji HK, Lenox RH (1999) Ziskind-somerfeld research award. Protein kinase C signaling in the brain: molecular transduction of mood stabilization in the treatment of manic-depressive illness. *Biol Psychiatry* 46:1328–1351.
- Martina M, Turcotte ME, Halman S, Bergeron R (2007) The sigma-1 receptor modulates NMDA receptor synaptic transmission and plasticity via SK channels in rat hippocampus. *J Physiol* 578:143–157.
- Mathews DC, Henter ID, Zarate CA (2012) Targeting the glutamatergic system to treat major depressive disorder: rationale and progress to date. *Drugs* 72:1313–1333.
- Mitterauer BJ (2011) Downregulation and upregulation of glial connexins may cause synaptic imbalances responsible for the pathophysiology of bipolar disorder. *CNS Neurosci Ther* 17:281–293.
- Naughton M, Clarke G, O'Leary OF, Cryan JF, Dinan TG (2014) A review of ketamine in affective disorders: current evidence of clinical efficacy, limitations of use and pre-clinical evidence on proposed mechanisms of action. *J Affect Disord* 156:24–35.
- O'Brien WT, Harper AD, Jové F, Woodgett JR, Maretto S, Piccolo S, Klein PS (2004) Glycogen synthase kinase-3beta haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium. *J Neurosci* 24:6791–6798.
- Ongür D, Jensen JE, Prescott AP, Stork C, Lundy M, Cohen BM, Renshaw PF (2008) Abnormal glutamatergic neurotransmission and neuronal-glia interactions in acute mania. *Biol Psychiatry* 64:718–726.
- Perry W, Minassian A, Henry B, Kincaid M, Young JW, Geyer MA (2010) Quantifying over-activity in bipolar and schizophrenia patients in a human open field paradigm. *Psychiatry Res* 178:84–91.
- Poels EM, Kegeles LS, Kantrowitz JT, Slifstein M, Javitt DC, Lieberman JA, Abi-Dargham A, Girgis RR (2014) Imaging glutamate in schizophrenia: review of findings and implications for drug discovery. *Mol Psychiatry* 19:20–29.
- Polter A, Beurel E, Yang S, Garner R, Song L, Miller CA, Sweatt JD, McMahon L, Bartolucci AA, Li X, Jope RS (2010) Deficiency in the inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 increases sensitivity to mood disturbances. *Neuropsychopharmacology* 35:1761–1774.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229:327–336.
- Rajkowska G (2000) Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. *Biol Psychiatry* 48:766–777.
- Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Vicente-Sánchez A, Berrocoso E, Garzón J (2012) The mu-opioid receptor and the NMDA receptor associate in PAG neurons: implications in pain control. *Neuropsychopharmacology* 37:338–349.
- Rodríguez-Muñoz M, Cortés-Montero E, Pozo-Rodríguez A, Sánchez-Blázquez P, Garzón-Niño J (2015a) The ON:OFF switch, σ 1r-HINT1 protein, controls GPCR-NMDA receptor cross-regulation: implications in neurological disorders. *Oncotarget* 6:35458–35477.
- Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Herrero-Labrador R, Martínez-Murillo R, Merlos M, Vela JM, Garzón J (2015b) The σ 1 receptor engages the redox-regulated HINT1 protein to bring opioid analgesia under NMDA receptor negative control. *Antioxid Redox Signal* 22:799–818.
- Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Merlos M, Garzón-Niño J (2016) Endocannabinoid control of glutamate NMDA receptors: the therapeutic potential and consequences of dysfunction. *Oncotarget* 7:55840–55862.
- Rojas A, Dingledine R (2013) Ionotropic glutamate receptors: regulation by G-protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* 83:746–752.
- Sánchez-Blázquez P, Pozo-Rodríguez A, Merlos M, Garzón J (2018) The sigma-1 receptor antagonist, S1RA, reduces stroke damage, ameliorates post-stroke neurological deficits and suppresses the overexpression of MMP-9. *Mol Neurobiol* 55:4940–4951.
- Sánchez-Blázquez P, Rodríguez-Muñoz M, Vicente-Sánchez A, Garzón J (2013) Cannabinoid receptors couple to NMDA receptors to reduce the production of NO and the mobilization of zinc induced by glutamate. *Antioxid Redox Signal* 19:1766–1782.
- Sánchez-Blázquez P, Rodríguez-Muñoz M, Herrero-Labrador R, Burgueño J, Zamanillo D, Garzón J (2014) The calcium-sensitive sigma-1 receptor prevents cannabinoids from provoking glutamate NMDA receptor hypofunction: implications in antinociception and psychotic diseases. *Int J Neuropsychopharmacol* 17:1943–1955.
- Savitz J, Solms M, Ramesar R (2005) Neuropsychological dysfunction in bipolar affective disorder: a critical opinion. *Bipolar Disord* 7:216–235.
- Sourial-Bassillious N, Rydelius PA, Aperia A, Aizman O (2009) Glutamate-mediated calcium signaling: a potential target for lithium action. *Neuroscience* 161:1126–1134.
- Szabo ST, Machado-Vieira R, Yuan P, Wang Y, Wei Y, Falke C, Cirelli C, Tononi G, Manji HK, Du J (2009) Glutamate receptors as targets of protein kinase C in the pathophysiology and treatment of animal models of mania. *Neuropharmacology* 56:47–55.
- Vela JM, Merlos M, Almansa C (2015) Investigational sigma-1 receptor antagonists for the treatment of pain. *Expert Opin Investig Drugs* 24:883–896.
- Wang J, Mack AL, Coop A, Matsumoto RR (2007) Novel sigma (sigma) receptor agonists produce antidepressant-like effects in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 17:708–716.
- Young JW, Henry BL, Geyer MA (2011) Predictive animal models of mania: hits, misses and future directions. *Br J Pharmacol* 164:1263–1284.
- Zarate CA, Manji HK (2009) Protein kinase C inhibitors: rationale for use and potential in the treatment of bipolar disorder. *CNS Drugs* 23:569–582.
- Zhu LQ, Wang SH, Liu D, Yin YY, Tian Q, Wang XC, Wang Q, Chen JG, Wang JZ (2007) Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits long-term potentiation with synapse-associated impairments. *J Neurosci* 27:12211–12220.

The Axonal Motor Neuropathy-Related HINT1 Protein Is a Zinc- and Calmodulin-Regulated Cysteine SUMO Protease

Elsa Cortés-Montero, María Rodríguez-Muñoz, Pilar Sánchez-Blázquez, and Javier Garzón

Abstract

Aims: Histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) exhibits proapoptotic and tumor-suppressive activity. HINT1 binds to transcription factors such as teneurin1 and to the regulator of G protein signaling 17 (RGS) (Z2) protein, which incorporates the small ubiquitin-like modifier (SUMO), and is implicated in several types of cancer. HINT1 interacts with proteins such as PKC γ and Raf-1 through zinc ions provided by the cysteine-rich domain of RGSZ2 and the coupled neural nitric oxide synthase (nNOS). Recently, a series of HINT1 mutants have been reported to cause human autosomal recessive axonal neuropathy with neuromyotonia (ARAN-NM). However, the specific alteration in the function of HINT1 induced by these mutants remains to be elucidated. Because sumoylation modifies protein association and transcriptional regulation, we investigated whether HINT1 exhibits zinc- and redox-regulated sumoylase activity, which may be altered in those mutants.

Results: HINT1 exhibits cysteine protease activity to remove SUMO from a variety of signaling proteins. HINT1 sumoylase activity is blocked by zinc, and it is released by nitric oxide or calcium-activated calmodulin (CaM). HINT1 contains a SUMO-interacting motif (110–116 HIHLHVL) and the catalytic triad Cys84-Asp87-His114 in the C-terminal region. Thus, zinc probably provided by the RGSZ2–nNOS complex may bind to Cys84 to block HINT1 isopeptidase activity.

Innovation: To date, HINT1 is the only sumoylase that is regulated by two alternate pathways, redox- and calcium-activated CaM.

Conclusion: The 15 human HINT1 mutants reported to cause ARAN-NM exhibited altered sumoylase activity, which may contribute to the onset of this human motor disease. *Antioxid. Redox Signal.* 31, 000–000.

Keywords: HINT1, desumoylase, zinc, nitric oxide, cysteine oxidation, calmodulin

Introduction

THE HISTIDINE TRIAD nucleotide-binding protein 1 (HINT1) is a zinc-binding protein of ~ 14 kDa that is highly conserved in phylogeny. HINT1 is widely expressed in the central nervous system (CNS) and other tissues (27, 32), and at the cellular level, this protein is present in the plasma membrane, nucleus, and cytoplasm. HINT1 was initially described as a

protein kinase C (PKC)-inhibiting protein (39), and, indeed, conventional PKC γ and PKC α establish nitric oxide (NO) and zinc-dependent inhibitory associations with HINT1 (43, 44). Later, crystallization studies indicated that HINT1 exists as a homodimer with the protomers interacting through their C-terminal sequences (26, 35), and its amino acid sequence revealed that it belongs to the histidine triad (HIT) family with HINT2 and HINT3 as its closest paralogs. In *in vitro* assays, the

Neuropharmacology, Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain.

© Elsa Cortés-Montero, *et al.* 2019; Published by Mary Ann Liebert, Inc. This Open Access article is distributed under the terms of the Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Innovation

Histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) exhibits zinc-regulated cysteine protease activity to desumoylate a variety of substrates. In addition, in contrast to its adenylate hydrolase activity, this novel function is not shared by HINT2 and HINT3 proteins. HINT1 is the only sumoylase regulated by redox and calmodulin signaling. Similar to the second family of sumoylases, desumoylating isopeptidases, HINT1 has a dimeric structure, forms stable complexes with substrates, and exhibits poor endopeptidase activity toward small ubiquitin-like modifier precursor forms. This activity of HINT1 may be essential for its antitumor activity and regulation of transcription factors. Thus, HINT1 dysfunction may contribute to different types of cancer and to axonal neuropathies with neuromyotonia.

HINT protein family exhibits phosphoramidase activity for adenosine-5'-*O*-monophosphoramidate and acts as efficient aminoacyl-adenylate hydrolases (8, 11). In addition, HINT1 catalyzes lysyl-adenylate generated by lysyl-tRNA synthetase and the desulfuration of 5'-*O*-phosphorothioylated nucleosides (22, 38).

Recently, interest in this protein has increased considerably because an initial report described a series of human HINT1 mutants as the cause of the devastating condition autosomal recessive axonal neuropathy with neuromyotonia (ARAN-NM) (73). Actually, 15 HINT1 mutants have been implicated in the pathophysiology of this neural dysfunction (34, 40, 62). Evidently, the identification of HINT1 features, which may be altered in these human mutants, is of outstanding interest. Thus, a few of the HINT1 mutants exhibit anomalies in their hydrolase lysyl-adenylate activity or in their capacity to constitute the dimeric form (54), whereas other HINT1 mutants still display normal enzymatic activity, which is independent of HINT1 proapoptotic activity (66). These data suggest another not-yet-discovered HINT1 function, which could be altered in the ARAN-NM mutants.

The current literature describes the enzymatic activity of HINT1 mentioned earlier and that zinc- and redox-dependent and -independent processes weave together to enable HINT1 to interact with a series of signaling proteins in the CNS. HINT1 interacts with G protein-coupled receptors (GPCRs) (18) and inotropic glutamate *N*-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) (42, 44). HINT1 binds simultaneously to the cytosolic C terminus of the mu-opioid receptor (MOR) (18) and to regulators of G protein signaling (RGS) proteins of the Rz family, such as RGSZ1 and RGSZ2 (1, 45). In the ternary complex GPCR-HINT1-RGSZ2, HINT1 signaling is regulated by zinc and redox processes. RGSZ2, which carries a zinc-binding cysteine-rich domain (CRD) at their N-terminal sequence (50), is associated with the N-terminal PDZ domain of neural nitric oxide synthase (nNOS) (14). MOR or NMDAR activation promotes nNOS production of NO to remove zinc ions from RGSZ2 CRD (48, 50). Subsequently, conventional PKCs, such as PKC α and PKC γ , or Raf-1, bind through their respective CRDs to HINT1 in a zinc-dependent manner (44, 47).

HINT1 couples with the cleaved N-terminal intracellular domain (ICD) of transmembrane protein teneurin1 (51), and,

in the nucleus, this complex induces the activity of the microphthalmia-associated transcription factor (51). HINT1 also inhibits the transcription of target genes (10) and forms a stable association with the Pontin/Reptin complex to inhibit the β -catenin transcriptional pathway (60, 65). Therefore, HINT1 plays a role as a transcriptional repressor. In this context, HINT1 is recruited by the DNA damage response (21, 24), triggers apoptosis (66), exhibits tumor-suppressive activity (25, 57, 70), and inhibits proliferation in human gastric and colon cancer cells (61, 64).

In searching for the unknown activity of HINT1, we noticed that a series of HINT1-interacting proteins, such as transcription factors and RGS-Rz proteins, which have been implicated in multiple human cancers (7, 19), are regulated by covalent conjugation of the small ubiquitin-like modifier (SUMO) (16, 41). Notably, sumoylated RGSZ1 and RGSZ2 proteins are found not only at the neural membrane but also in the nucleus (41), where, as reported for ICD teneurin1, they interact with HINT1 to participate in transcriptional processes. As HINT1 interactions with signaling proteins and nucleotide hydrolase activity can be regulated by zinc (43, 53), we studied whether HINT1 might regulate SUMO post-translational modification of interacting proteins by zinc and redox mechanisms and whether such a novel function was found to be altered in the ARAN-NM-related mutants. SUMO proteases are cysteine proteases with at least one histidine in the catalytic site (20), and HINT1 fulfills this criterion because it carries two cysteines and seven histidines in its sequence.

Our study shows that HINT1 cleaves sumoylated substrates, such as RGS-Rz proteins, ICD teneurin1, and Ran GTPase activating protein 1 (RanGAP1), and that this activity is inhibited by zinc and promoted by NO or calcium-activated calmodulin (CaM). Notably, isopeptidase activity was altered in the fifteen human HINT1 mutants reported thus far.

Results

In humans, the HINT family includes three members, HINT1 with 126 amino acids, HINT2 with 163 amino acids, and HINT3 with 165 amino acids (Fig. 1A). Close to their C terminus, these proteins contain the conserved HIT, which alternates with hydrophobic amino acids HI(L)HL(I)HVL(I) in a typical setup of a SUMO-interacting motif (SIM) (71). In *in vitro* assays, we observed that HINT1, but not HINT2 or HINT3, bound to SUMO1 and SUMO2 proteins. Moreover, protein analysis indicated the presence of a CaM-binding motif but in a different amino acid sequence for each of the HINT proteins (68). Thus, HINT1 and HINT3 exhibited binding to CaM, and in the presence of physiological levels of calcium (2.5 mM), the HINT1-CaM association was increased (Fig. 1B). Accordingly, the T17A mutation inside the predicted HINT1 CaM binding motif (12–31 QPGGDTIFGKIIRKEIPAKI) abrogated Ca²⁺-CaM binding. On the other hand, SUMO2-HINT1 association was greatly reduced after altering the predicted SIM amino acids, that is, in V115D and L116Q and to a lesser extent in the HINT1 mutants of the accompanying H112N and H114R (Fig. 1C) [$F(4,15) = 169.175$, $p < 0.001$; V115D $t = 22.02$, $p < 0.001$; L116Q $t = 19.14$, $p < 0.001$; H112N $t = 13.37$, $p < 0.001$; H114R $t = 5.59$, $p < 0.01$].

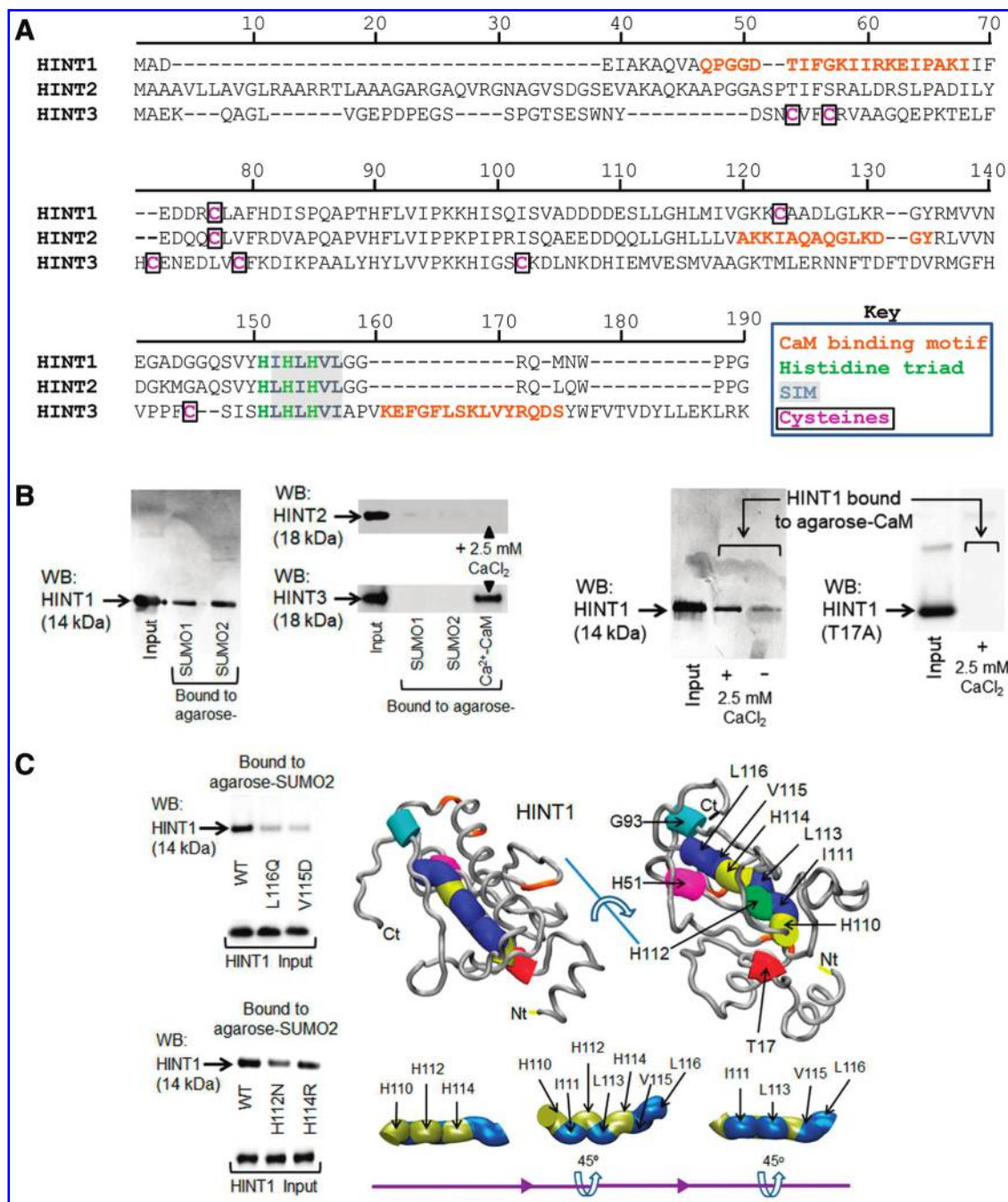


FIG. 1. HINT1 binds to SUMO proteins and calcium-activated CaM. (A) Sequence alignment of the three HINT proteins showing their limited similarity to the HIT linear sequence. Each HINT protein contains a putative CaM-binding motif but with a different amino acid sequence. (B) HINT1 but not HINT2 or HINT3 binds SUMO proteins. HINT1 and HINT3 but not HINT2 bind CaM in the presence of 2.5 mM CaCl₂. (C) HINT1 linear sequence 110–116 contains the HIT and the SIM, which form opposing surfaces. The HINT1 SIM mutants studied weakly bind to SUMO. The HINT1 3D structure is shown as a tube with reference amino acids as colored cylinders (tube occupancy). The HINT1 protein and the SIM-His triad region are rotated to show their 3D organization. The HINT structural models shown herein were predicted by Novafold (DNASTAR, Inc., Madison, WI). Details of immunoblot detection in “Materials and Methods” section and Supplementary Figure S4. 3D, three-dimensional; CaM, calmodulin; HINT1, histidine triad nucleotide-binding protein 1; HIT, histidine triad; SIM, sumo-interacting motif; SUMO, small ubiquitin-like modifier. Color images are available online.

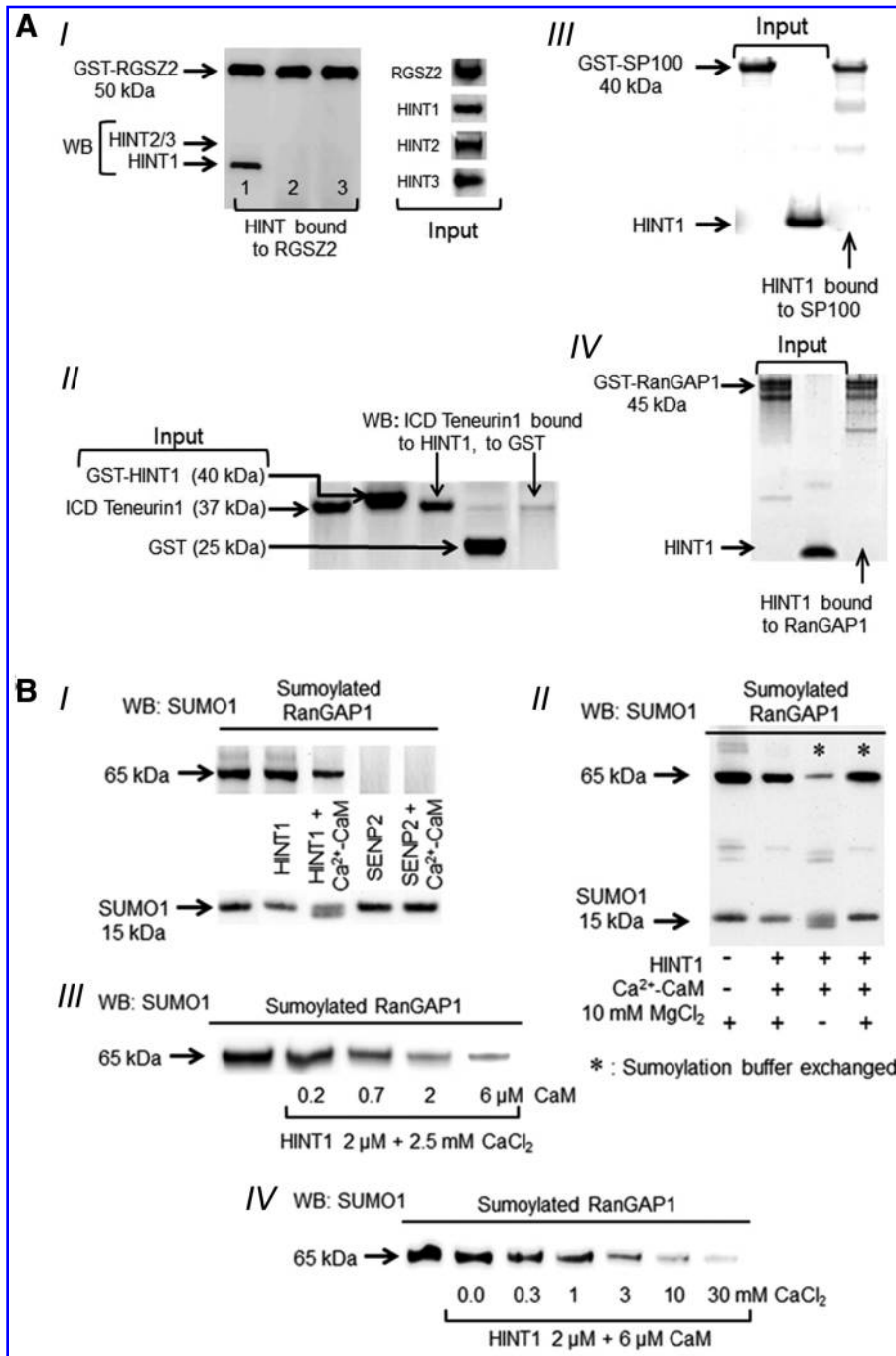


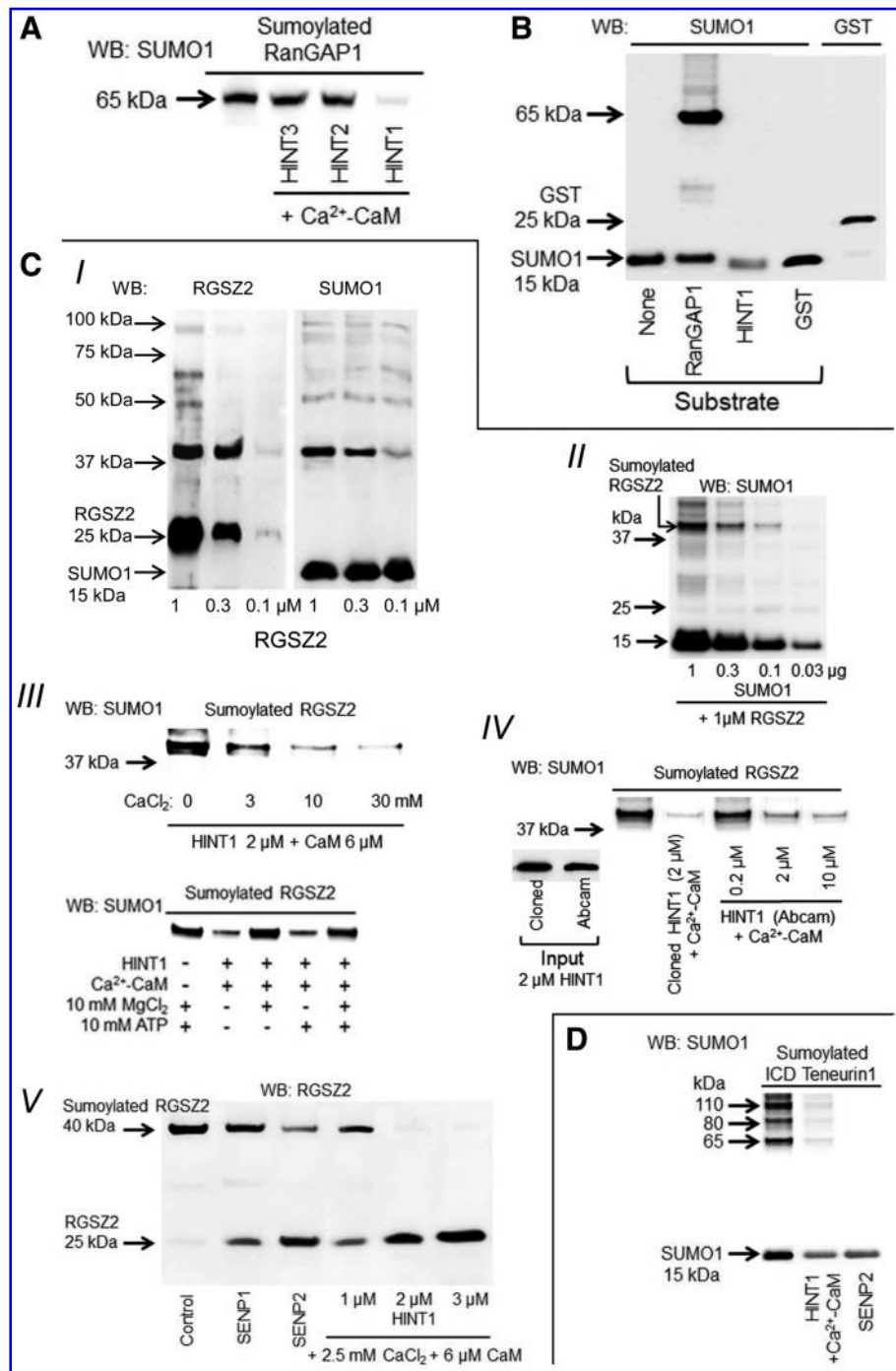
FIG. 2. HINT1 exhibits isopeptidase activity. (A) HINT1 interactions with the proteins used in the study. (I) HINT1 but not its paralogs forms stable complexes with RGSZ2 proteins. (II) ICD teneurin1 interacts with HINT1 but not with GST. (III, IV) HINT1 associations with RanGAP1 and SP100 were weak or not detected. (B) HINT1 exhibits SUMO protease activity on sumoylated RanGAP1, which is regulated by calcium and CaM. (I) HINT1 (2 μM) but not SENP2 (0.3 μM) requires calcium-activated CaM (6 μM) to exhibit sumoylase activity. (II) Removal of 10 mM MgCl₂ from the sumoylation buffer greatly improves Ca²⁺-CaM-dependent HINT1 isopeptidase activity on sumoylated RanGAP1. (III, IV) HINT1 exhibits isopeptidase activity on sumoylated RanGAP1 in the presence of increasing concentrations of CaCl₂ and of CaM. Details of immunoblot detection in “Materials and Methods” section and Supplementary Figures S5 and S6. GST, glutathione S-transferase; ICD, intracellular domain; RanGAP1, Ran GTPase-activating protein 1; RGSZ2, regulator of G protein signaling 17 (Z2); SENP, sentrin-specific protease.

In *in vitro* assays, HINT1 formed stable complexes with ICD teneurin1 and HINT1, but not HINT2 or HINT3, associated with the RGSZ2 protein, with 2.5 mM calcium promoting and Ca²⁺-CaM diminishing these associations (Fig. 2A[I, II], Supplementary Fig. S1A, B). Stable interactions were not observed for HINT1 with glutathione S-transferase (GST) or with proteins frequently used in *in vitro* sumoylation assays such as SP100 and a RanGAP1 fragment (Fig. 2A[III, IV]). Initially, we addressed the isopeptidase activity of HINT1 on sumoylated RanGAP1 in the presence of the sumoylation mix. Although SUMO/sentrin-specific protease 2 (SENP2) efficaciously removed SUMO1 from sumoylated RanGAP1, the HINT1 protein achieved only partial

removal of SUMO1, and their activity was similar in the absence or presence of additional Ca²⁺-CaM (Fig. 2B[I]). Because the sumoylation buffer contained 10 mM MgCl₂, and Mg²⁺ may interfere with calcium activation of CaM (15), the activity of HINT1 was addressed in the absence of Mg²⁺ (buffer exchange). Under these conditions, HINT1 efficaciously removed SUMO1 from RanGAP1 (Fig. 2B[III]), and the isopeptidase activity of 2 μM HINT1 was maximal in the presence of 6 μM CaM and ~10 mM CaCl₂ (Fig. 2B[III, IV]).

In the following assays, the sumoylase activity of HINT1 was determined while maintaining the parameters mentioned earlier. In these experimental conditions, HINT2 and HINT3 did not exhibit sumoylase activity (Fig. 3A). In the *in vitro*

FIG. 3. HINT1 removes SUMO1 from sumoylated RanGAP1, RGSZ2, and ICD teneurin1. (A) HINT2 and HINT3 do not exhibit Ca^{2+} -CaM-dependent sumoylase activity. (B) In the RanGAP1 sumoylation assay, HINT1 and GST did not incorporate SUMO. (C[I, II]) The RGSZ2 protein incorporated SUMO1. (III) HINT1 cleaved SUMO from the RGSZ2 protein in a calcium- and CaM-dependent manner. HINT1 isopeptidase activity on sumoylated RGSZ2 greatly diminished in the presence of 10 mM MgCl_2 but not 10 mM ATP. (IV) HINT1 from a different source (Abcam; #ab87362) exhibited sumoylase activity on RGSZ2 similar to that observed with our cloned HINT1. (V) HINT1, SENP1, and SENP2 desumoylated and preserved RGSZ2 size. (D) ICD teneurin1 showed various putative sites for sumoylation (71). HINT1 and SENP2 desumoylated ICD teneurin1. Further details of immunoblot detection in “Materials and Methods” section and Supplementary Figures S6 and S7.

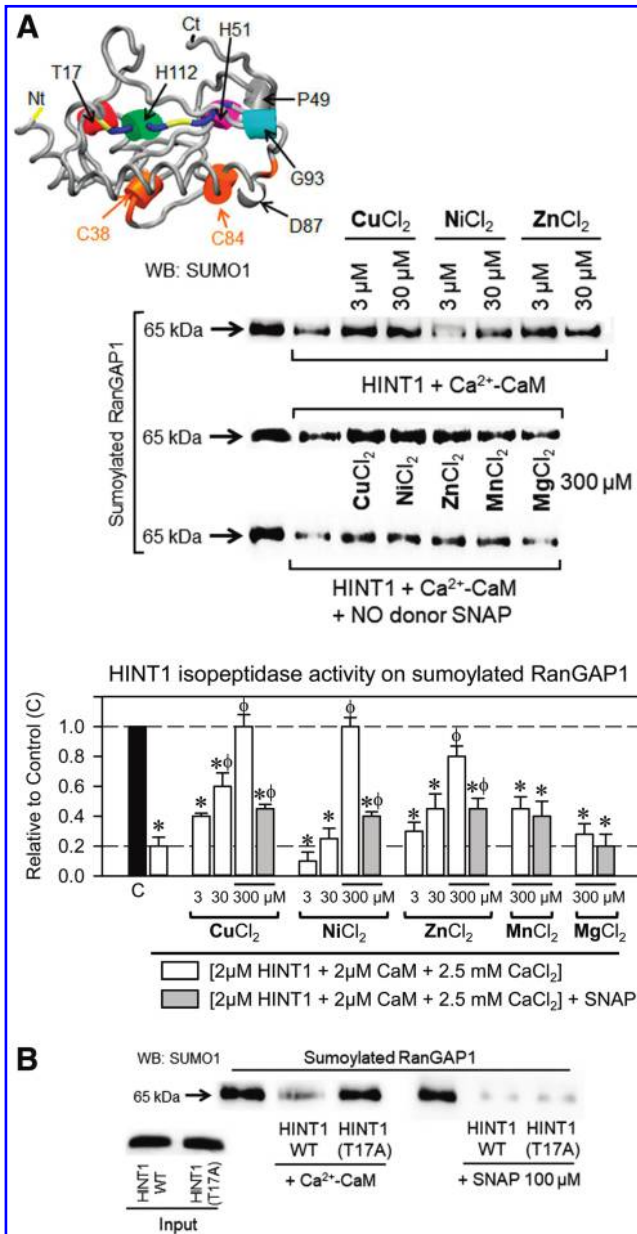


sumoylation assay, HINT1 and GST did not incorporate SUMO1 (Fig. 3B). HINT1 also displayed isopeptidase activity to remove SUMO from its interacting proteins RGSZ2 and ICD teneurin1. The sumoylation of RGSZ2 was SUMO1 dependent and provided a main band of ~ 40 kDa (Fig. 3C[I, II]). In the presence of Ca^{2+} -CaM, HINT1 efficaciously removed SUMO1 from the RGSZ2 protein, whereas 10 mM MgCl_2 but not 10 mM ATP diminished its isopeptidase activity (Fig. 3C[III]). We observed that recombinant HINT1 obtained from a commercial source (Abcam plc, Cambridge, United Kingdom; #ab87362) also removed SUMO1 from sumoylated RGSZ2 (Fig. 3C[IV]). Desumoylation of RGSZ2

by HINT1 and SENP1/2 preserved the native protein, which was now detected at 25 kDa (Fig. 3C[V]). HINT1 and SENP2 also removed SUMO from ICD teneurin1 (Fig. 3D). In contrast to the result observed for SENP2, HINT1 barely desumoylated SP100 or cleaved polymeric SUMO2/3 chains and lacked SUMO-processing activity (Supplementary Fig. S2A–C).

The purine nucleoside phosphoramidase and adenylate hydrolase activity of HINT1 is reduced by a series of divalent cations (53), and Ca^{2+} -CaM-activated HINT1 isopeptidase activity is also diminished in the presence of Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Ni^{2+} chloride salts. Although 10 mM Mg^{2+} abrogated the

effect of Ca^{2+} -CaM (Fig. 2B[II]), Mg^{2+} and Mn^{2+} up to $300 \mu\text{M}$ had no effect in this paradigm (Fig. 4A). Cysteines and histidines are the amino acids that exhibit the greatest affinity for divalent metal cations such as Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Ni^{2+} (72), and NO disrupts their binding to cysteine thiol groups but not to histidines (29). In the presence of *S*-nitroso-*N*-acetyl-DL-penicillamine (SNAP), an NO donor, the capacity of Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Ni^{2+} to antagonize HINT1 sumoylase activity diminished. These observations suggested that HINT1 sumoylase activity was promoted by NO. Indeed, Ca^{2+} -CaM failed to activate SUMO protease activity in the HINT1 T17A mutant, which exhibited this activity in the presence of SNAP (Fig. 4B). Other NO donors, such as (2*E*,3*E*)-4-ethyl-2-(hydroxyimino)-5-nitro-3-hexeneamide (NOR-3) and spermine NONOate, also promoted HINT1 sumoylase activity and this activity was observed even in the presence of 10 mM MgCl_2 (Supplementary Fig. S1C).



HINT1 removed SUMO from RGSZ2 proteins with a T50 of ~ 10 – 15 min and was slightly faster when SNAP, instead of Ca^{2+} -CaM, was the activator (Fig. 5A). The addition of zinc ions interrupted the Ca^{2+} -CaM-activated isopeptidase activity of HINT1 but failed when SNAP/NO promoted this activity (Fig. 5B). These observations strongly suggested that HINT1 isopeptidase activity is inhibited by divalent metal cations, such as zinc, and, indeed, the metal chelator *N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) promoted HINT1 de-sumoylase activity in the absence of Ca^{2+} -CaM or SNAP (Supplementary Fig. S1D). In the presence of Ca^{2+} -CaM or SNAP, the C38S HINT1 mutant exhibited SUMO protease activity on sumoylated RanGAP1, RGSZ2, or ICD teneurin1; however, this activity was not observed in the C84S HINT1 mutant (Fig. 6A). The HINT1 mutant D87V was devoid of spontaneous or SNAP-activated isopeptidase activity, suggesting its participation in the catalytic triad (Fig. 6B). Although the HINT1 human mutant H51R exhibited spontaneous desumoylase activity on sumoylated RGSZ2, other HINT1 human histidine mutants, such as H112N and H114R, were devoid of isopeptidase function (Fig. 6C). Inappropriate storage of recombinant HINT1 favored the formation of Cys84-dependent dimers and trimers, which were disrupted by reducing agents such as β -mercaptoethanol. These interactions later become resilient to reduction and negatively affect the capacity of HINT1 to remove SUMO (Supplementary Fig. S3A, B).

As mentioned earlier, HINT1 displays nucleoside phosphoramidase and acyl-AMP hydrolase activity in *in vitro* assays. This HINT1 enzymatic activity can be promoted by phosphoramidate tryptamine AMP (TpAd) and inhibited by guanosine-5'-tryptamine carbamate (TpGc) (3, 4). Notably, in our desumoylation assay, TpAd and TpGc reduced the activity of HINT1 in a concentration-dependent manner with apparent ED50s of 320 and 403 nM, respectively (Fig. 7A), suggesting that HINT1 enzymatic activities may share critical amino acid residues at the catalytic site and HIT/SIM domain.

FIG. 4. Effect of divalent metal ions on HINT1 and SENP2 isopeptidase activity and identification of the HINT1 CaM-binding motif.

(A) Concentrations of 3, 30, and $300 \mu\text{M}$ chloride salts of Cu, Ni, Zn, Mn, and Mg divalent metal cations were added to HINT1 ($2 \mu\text{M}$) desumoylation buffer of sumoylated-RanGAP1. The concentration of $300 \mu\text{M}$ of the aforementioned salts was also studied in the presence of the NO donor SNAP ($100 \mu\text{M}$). Each bar is the computed mean \pm standard error of the mean of three determinations. Data refer to the control group, which did not include HINT1 and was assigned an arbitrary value of 1; “*” significantly different compared with the control group, “ ϕ ” indicates a significant difference from the group that received HINT1 but not the metal ion. ANOVA, Holm-Sidak multiple comparisons, $p < 0.05$. (B) The predicted CaM-binding site in the HINT1 protein is located in its N-terminal region. In the presence or absence of Ca^{2+} -CaM, the HINT1 T17A mutant did not exhibit isopeptidase activity; however, the NO donor SNAP ($100 \mu\text{M}$) rescued T17A HINT1 sumoylase activity on RanGAP1, which was comparable to that of the WT. Further details of NO donors in Supplementary Figure S1C. ANOVA, analysis of variance; NO, nitric oxide; SNAP, *S*-nitroso-*N*-acetyl-DL-penicillamine; WT, wild type. Color images are available online.

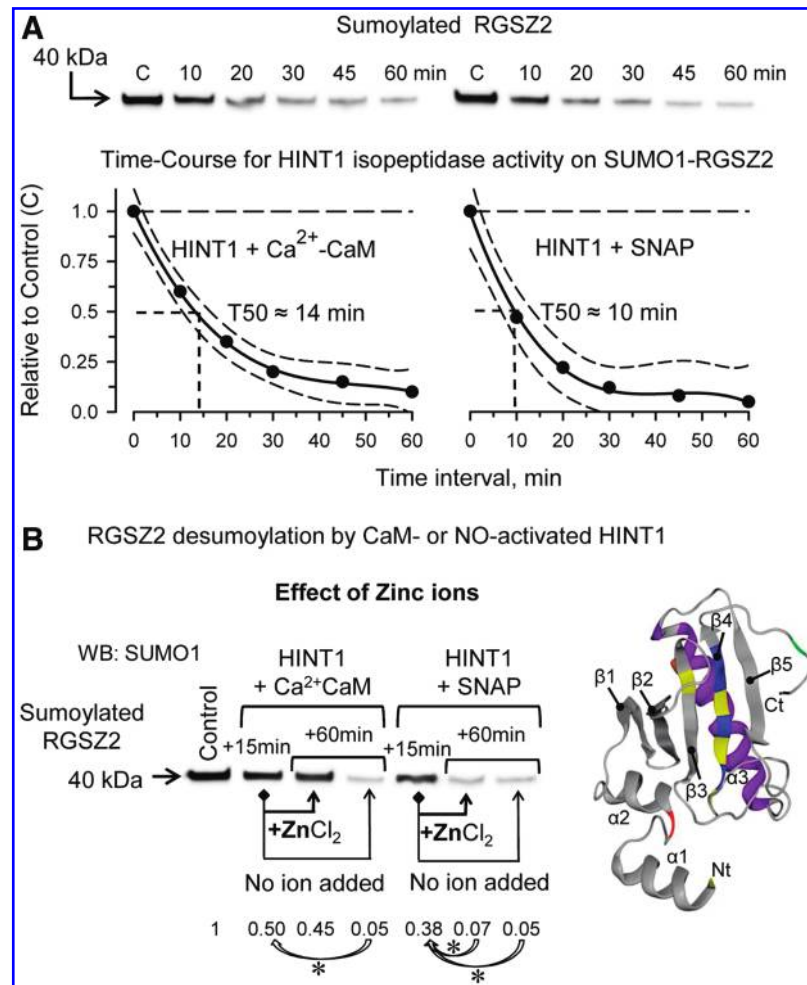


FIG. 5. HINT1 isopeptidase activity, time-course and effect of zinc ions. (A) Time-course for HINT1 activated by Ca²⁺-CaM to remove SUMO1 from the RGSZ2 protein. The data were analyzed by nonlinear regression (Sigmaplot/Sigmastat v 14.0; Systat Software, Inc.), (estimate ± SE): $r=0.97 \pm 0.04$, $T50=12.35 \pm 0.27$ min, $t=37.21$, DF total = 6, MS = 0.26, $p < 0.05$. Identical assay, but HINT1 was activated by the NO-donor SNAP (estimate ± SE): $r=0.99 \pm 0.07$, $T50=6.31 \pm 0.23$ min, $t=57.79$, DF total = 6, MS = 0.215, $p < 0.05$. “C” denotes control group without HINT1 isopeptidase activator. The curve fits and 95% confidence intervals are shown. (B) Zinc ions added during the time-course blocked HINT1 isopeptidase activity activated by Ca²⁺-CaM, but failed when NO was the activator. HINT1 (2 μM), SNAP (100 μM), CaCl₂ (2.5 mM), CaM (6 μM), sumoylated RGSZ2 (1 μM), and ZnCl₂ (300 μM). Data refer to the control group, which did not include HINT1 and was assigned an arbitrary value of 1; “*” for each group, Ca²⁺-CaM or SNAP indicates a significant difference with respect to the +15-min time interval. ANOVA, Holm-Sidak multiple comparisons, $p < 0.05$. Further details of immunoblot detection in “Materials and Methods” section and Supplementary Figure S8. DF, degrees of freedom; MS, mean square; SE, standard error. Color images are available online.

Several HINT1 interactions with third-partner proteins depend on zinc-bound cysteines, which are regulated by redox processes (43). In this study, σ 1R diminished the sumoylase activity of HINT1. However, σ 1R did not alter SENP2 activity (Fig. 7B). The cytosolic C-terminal sequence of NR1 abolished HINT1 isopeptidase function, but the cytosolic C-terminal region of MOR did not (Fig. 7C). Next, we explored the possible significance of this regulation of HINT1 isopeptidase activity *in vivo*. Mice were intracerebroventricularly injected with *N*-methyl-D-aspartate (NMDA), a glutamate NMDAR agonist, and the σ 1R antagonists S1RA and BD1063. These procedures diminish the *in vivo* association of NMDAR NR1 subunits and of σ 1Rs with MOR-HINT1 complexes (42, 44). After 30 min, we analyzed the coprecipitation of the RGSZ2 protein with

the MOR *ex vivo*. This association was barely detected in control mice but greatly increased in response to NMDA and σ 1R antagonists (Fig. 8A). Although NMDA promoted MOR-RGSZ2 associations in wild type (WT) mice, the effect was greater in σ 1R^{-/-} mice and absent in HINT1^{-/-} mice (Fig. 8B). The RGSZ2 coimmunoprecipitated with the MOR was sumoylated (Fig. 8C). Thus, *in vivo*, NMDARs and σ 1Rs negatively regulate the interaction of HINT1 proteins with sumoylated RGSZ2 proteins and probably its isopeptidase activity as well.

At the time we performed this study, the number of HINT1 mutants reported to cause ARAN-NM in humans was 15 (34, 40, 62). Thus, we addressed the capacity of these mutants to remove SUMO from sumoylated RGSZ2 and whether this activity was regulated by NO or Ca²⁺-CaM. Most HINT1

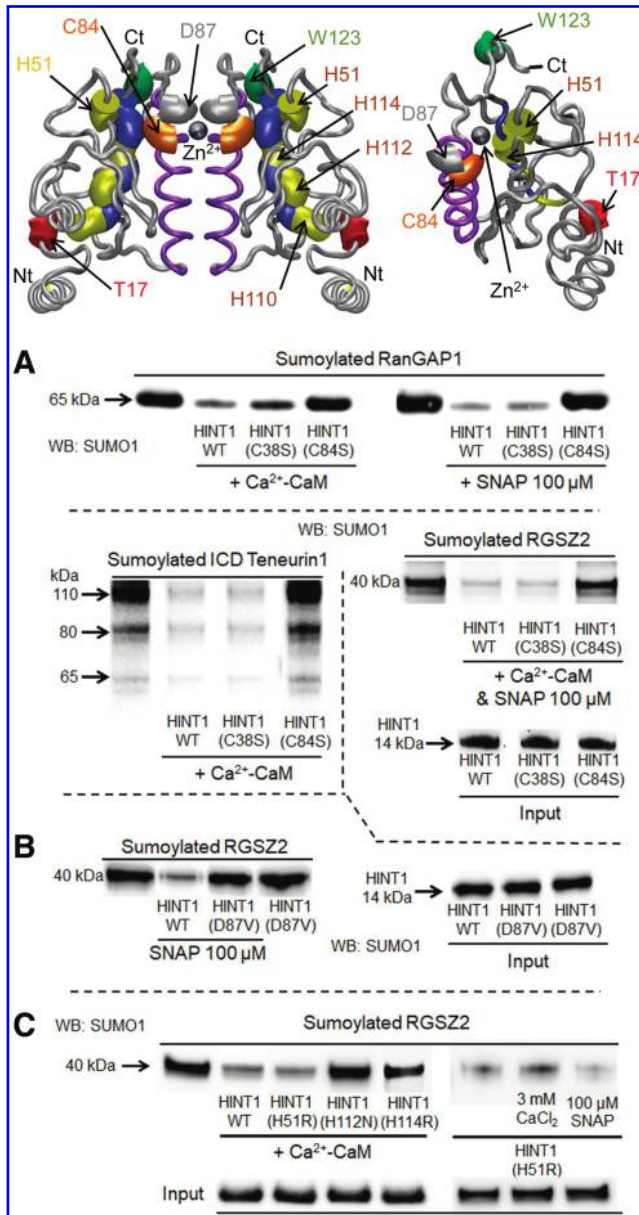


FIG. 6. Identification of HINT1 isopeptidase catalytic domain. (A) Identification of the cysteine residue implicated in isopeptidase activity. In the presence of Ca²⁺-CaM, SNAP, or both, the HINT1 C38S mutant but not the C84S cleaved SUMO from GST-RanGAP1, RGSZ2, and ICD teneurin1. (B) The HINT1 D87V mutant did not exhibit isopeptidase activity in the presence or absence of SNAP. (C) In the presence of Ca²⁺-CaM or SNAP, HINT1 mutants H112N and H114R did not exhibit isopeptidase activity on sumoylated RGSZ2, but H51R was active even in the absence of these activators. HINT1 (2 μM), CaCl₂ (2.5 mM), CaM (6 μM), SNAP (100 μM), sumoylated RGSZ2, ICD teneurin1, and RanGAP1 (1 μM). Further details of immunoblot detection in “Materials and Methods” section and Supplementary Figures S6 and S7. Color images are available online.

human mutants did not exhibit isopeptidase activity and could not be recruited by the activators mentioned earlier. However, C38R and H51R mutants showed deregulated full desumoylase activity, and E34K and R37P also exhibited deregulated but somehow lesser activity than the WT (Fig. 9). Because isopeptidase activity is absent from the cropped Q106* and W123* mutants, we inferred that the Q62* mutant, which lacks the sequence containing the catalytic triad, was also devoid of such enzymatic function.

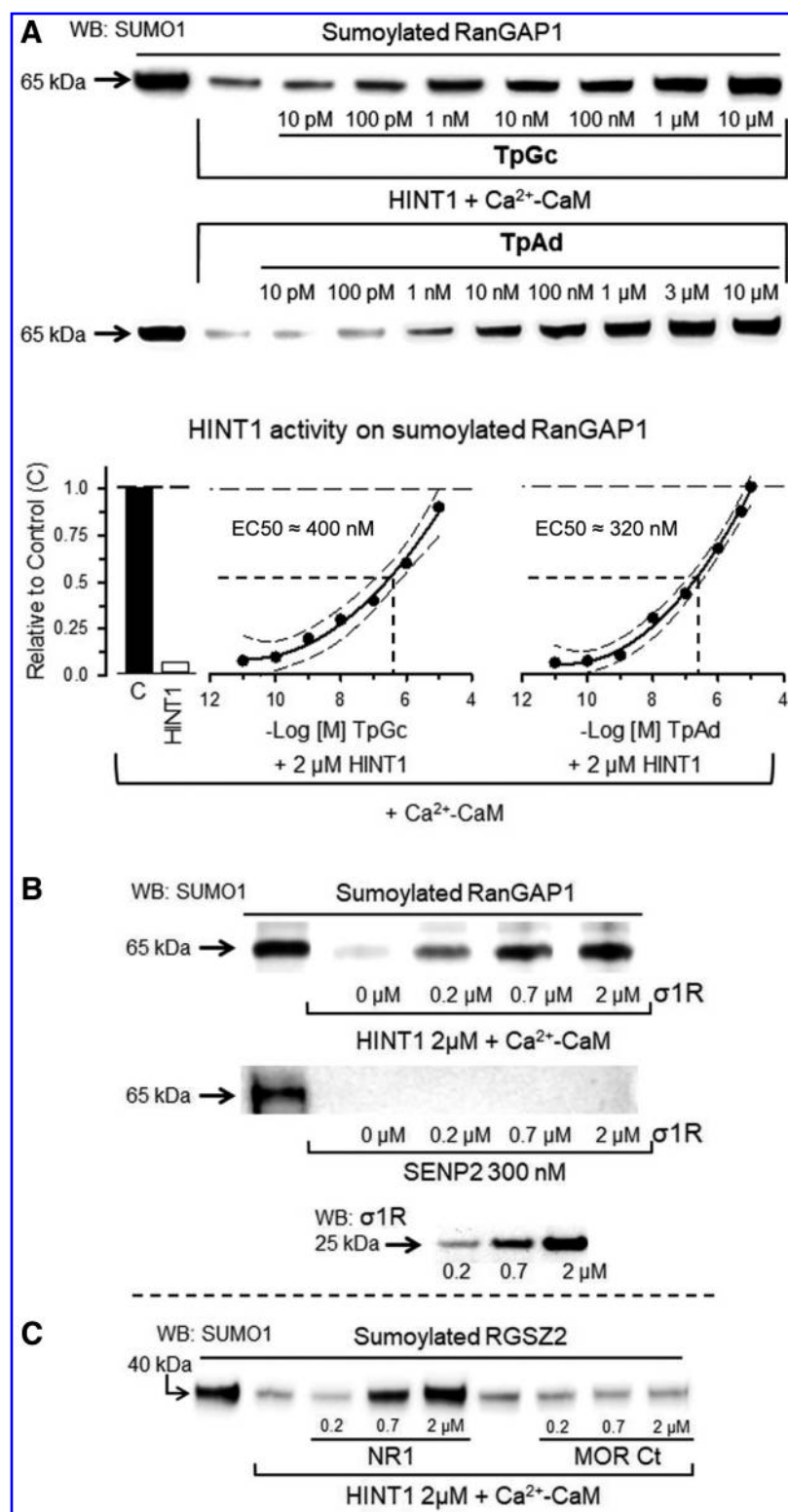
Discussion

This study reveals the zinc- and NO-regulated isopeptidase activity of the HINT1 protein, a new feature not shared by the structurally and phylogenetically related HINT2 and HINT3 proteins. The sumoylase activity of HINT1 was triggered by CaM, probably because this calcium-activated protein binds and sequesters inhibitory zinc ions (23, 63) from the HINT1 catalytic site. Thus, the capacity of HINT1 to remove SUMO from membrane and nuclear proteins, such as RGSZ2 and ICD teneurin1, may be of functional relevance to maintain synaptic tonus and to regulate nuclear gene transcription. Indeed, this activity was altered in the human HINT1 mutants that cause ARAN-NM.

Covalent protein sumoylation typically controls the interaction of the modified proteins with other proteins and is reversed by isopeptidases known as sumoylases. The first family of SUMO-specific proteases described was the SENP family, followed by the desumoylating isopeptidase (DeSI) family (58), and then by other isopeptidases related to the Axin-binding protein Axam (37). Sumoylases have the catalytic domain usually located close to the C terminus and contain a conserved His–Asp–Cys triad (5, 12). This triad is present in several cysteine proteases (9) where the cysteine is the nucleophile, the histidine is the base, and the aspartate is the acidic triad member that forms a hydrogen bond with the basic residue. SENPs and DeSIs contain SIM and cysteine-based catalytic sites at their C-terminal region. DeSIs but not SENPs form homodimers with the active site situated in the groove between the two protomers (58). Notably, HINT1 forms dimers, and the protomer contains a SIM at its C-terminal sequence. A series of observations, such as the activation of HINT1 isopeptidase by NO, which is absent in the C84S but not the C38S mutant; the reduction in HINT1 desumoylase function by *in vitro* Cys84-dependent formation of disulfide bridges between protomers; and Cys84 being the only computer-predicted S-nitrosylation site on this protein (67), indicate that HINT1 shares the cysteine protease catalytic organization.

DeSIs harbor only a catalytic dyad with Cys108 and His38, whereas the tridimensional structure of HINT1 suggests the presence of the triad. The HINT1 helical loop facing the dimer interface contains Cys84 close to Asp87, and the required histidine may be provided by His112 or His114, with the latter closer to Cys84 in the HINT1 three-dimensional (3D) structure. SENPs recognize a range of diverse substrates; however, DeSI1 shows sumoylase activity toward only a few substrates (56). In our study, HINT1 exhibited isopeptidase activity on sumoylated RGSZ2, ICD teneurin1, and RanGAP1, but it barely cleaved SUMO from SP100 and very weakly broke polySUMO2/3 chains. Unlike SENPs, HINT1 and DeSIs share their dimeric organization and an extremely low endopeptidase activity toward precursor forms of SUMO1 and SUMO2 (58).

FIG. 7. Regulation of HINT1 sumoylase activity by drugs affecting its adenylate hydrolase activity and third-partner interacting proteins. (A) The substrate TpAd, and the inhibitor TpGc of HINT1 adenylate hydrolase activity reduced the capacity of HINT1 to remove SUMO from RanGAP1 in a dose-dependent manner. The data were analyzed by nonlinear regression, competition at a single site (Sigmaplot/Sigmastat v 14.0; Systat Software, Inc.) and shown as curve fit and 95% confidence interval. TpGc (estimate \pm SE): $r=0.93 \pm 0.12$, $EC_{50}=403.18 \pm 12.20$ nM, $t=16.13$, DF total=7, MS=0.22, $p<0.05$; TpAd (estimate \pm SE): $r=0.97 \pm 0.11$, $EC_{50}=320.78 \pm 15.85$ nM, $t=19.31$, DF total=7, MS=0.39, $p<0.05$. **(B)** Effect of HINT1-interacting signaling proteins on HINT1 sumoylase activity: The σ 1R long isoform reduced the sumoylase activity of HINT1 but not SENP2 in a concentration-dependent fashion. **(C)** The cytosolic C-terminal region C0-C1-C2 of the NMDAR NR1 subunit, but not the C-terminal region of MOR, reduced HINT1 isopeptidase activity. Further details of immunoblot detection in “Materials and Methods” section. MOR, mu-opioid receptor; NMDAR, *N*-methyl-D-aspartate receptor; TpAd, phosphoramidate tryptamine AMP; TpGc, guanosine-5'-tryptamine carbamate.



Although the HINT1 sequence does not reveal a “zinc finger” structure, this protein has been identified as a zinc-binding protein (39); however, the capacity of HINT1 to bind calcium remains controversial (32, 33). Among the amino acids, cysteine and histidine display the highest affinity toward metal ions such as Ni²⁺, Zn²⁺, and Cu²⁺. Cysteine residues strongly bind to zinc ions and are the main target of NO

signaling through protein modification (29, 72). Thus, NO reacts with cysteine Zn/S sites, promoting the release of zinc and the S-nitrosylation of these thiol groups (29). The nitrosylation of cysteines is readily reversible, typically *via* the S-nitrosoglutathione reductase or thioredoxin systems (55). Because *in vitro* NO does not release zinc from histidines, our results indicate that the HINT1 isopeptidase catalytic site is

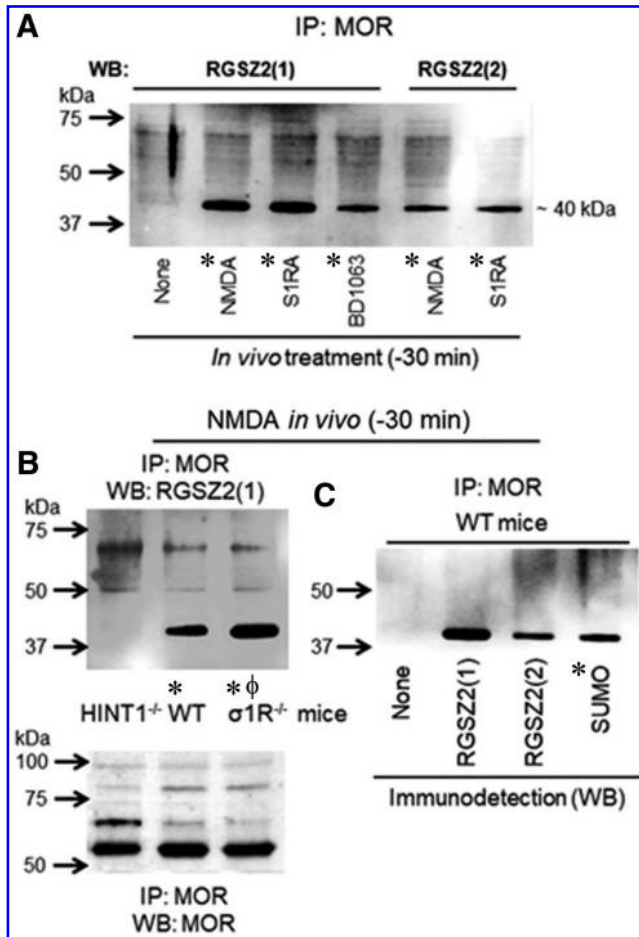


FIG. 8. *In vivo* regulation of σ 1R and glutamate NMDAR promotes HINT1 binding to sumoylated RGSZ2 proteins. (A) The icv administration of NMDA, a glutamate NMDAR agonist, or of S1RA and BD1063, σ 1R antagonists, greatly enhanced the coprecipitation of RGSZ2 proteins with MOR–HINT1 complexes. The mice were sacrificed 30 min after the icv-injection of the drugs, and *ex vivo* determinations were performed in cortex synaptosomes. IP, immunoprecipitation; WB, Western blot; carried out with two antibodies, RGSZ2(1) and RGSZ2(2), directed against distinct domains of the target protein. “*” Significantly different from the control group (stated as None). (B) The *in vivo* administration of NMDA to WT and σ 1R^{-/-} mice caused the association of sumoylated RGSZ2 with MOR but failed in HINT1^{-/-} mice, “*” significantly different from the HINT1^{-/-} group; “ ϕ ” significantly different from the WT group. (C) In NMDA-treated mice, the RGSZ2 associated with MOR–HINT1 was sumoylated, “*” significantly different from the control group (stated as None). (A–C) The assays were repeated at least twice. ANOVA, Holm-Sidak multiple comparisons, $p < 0.05$. Further details of immunoblot detection in “Materials and Methods” section and Supplementary Figure S9. icv, intracerebroventricular; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate.

regulated by a zinc ion bound to a cysteine residue, probably Cys84. This inhibitory switch can be removed by NO and CaM through its calcium-dependent binding to the HINT1 N-terminal sequence (23, 63). However, these HINT1-activating signaling pathways show differences. NO modifies the zinc target on Cys84, whereas CaM removes only the ion

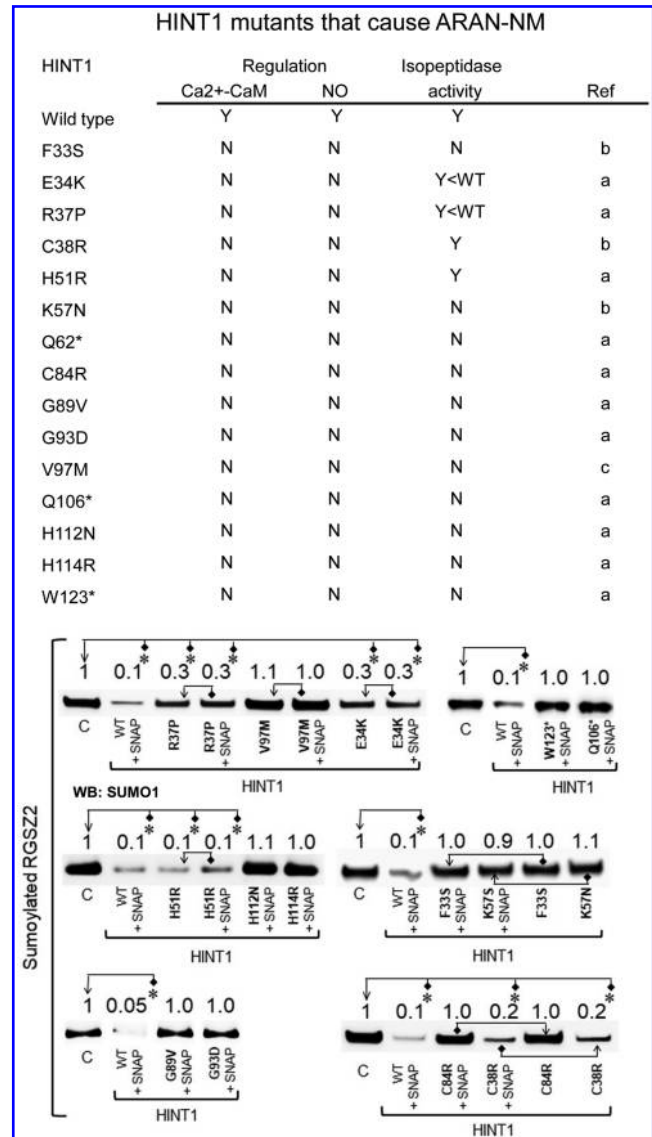


FIG. 9. Human HINT1 mutants that cause ARAN-NM exhibit impaired isopeptidase activity. The NO donor SNAP failed to activate the sumoylase activity in most of the human HINT1 mutants evaluated. The E34K, R37P, and H51R mutants showed deregulated spontaneous activity to remove SUMO1 from RGSZ2 proteins. Identical results were obtained by using Ca²⁺-CaM instead of SNAP (not shown). The HINT1 mutant Q62* in which the catalytic site is absent was assumed to lack isopeptidase activity. The *columns* describing isopeptidase activity and its regulation: N and Y indicate No and Yes, respectively; Y < WT denotes deregulated isopeptidase activity worse than that of the WT. Ref: references reporting the human HINT1 mutants: a (34); b (40); c (62). The assays were performed at least twice, and each point was duplicated. “*” Significant difference with respect to the control group (C, assigned an arbitrary value of 1), which contained the sumoylated RGSZ2 protein but not the HINT1 protein; ANOVA, Holm-Sidak multiple comparisons, $p < 0.05$. SNAP (100 μ M). Further details of immunoblot detection in “Materials and Methods” section and Supplementary Figure S10. HINT1 mutants not described in humans but included in the study are in Supplementary Table S1. ARAN-NM, autosomal recessive axonal neuropathy with neuromyotonia.

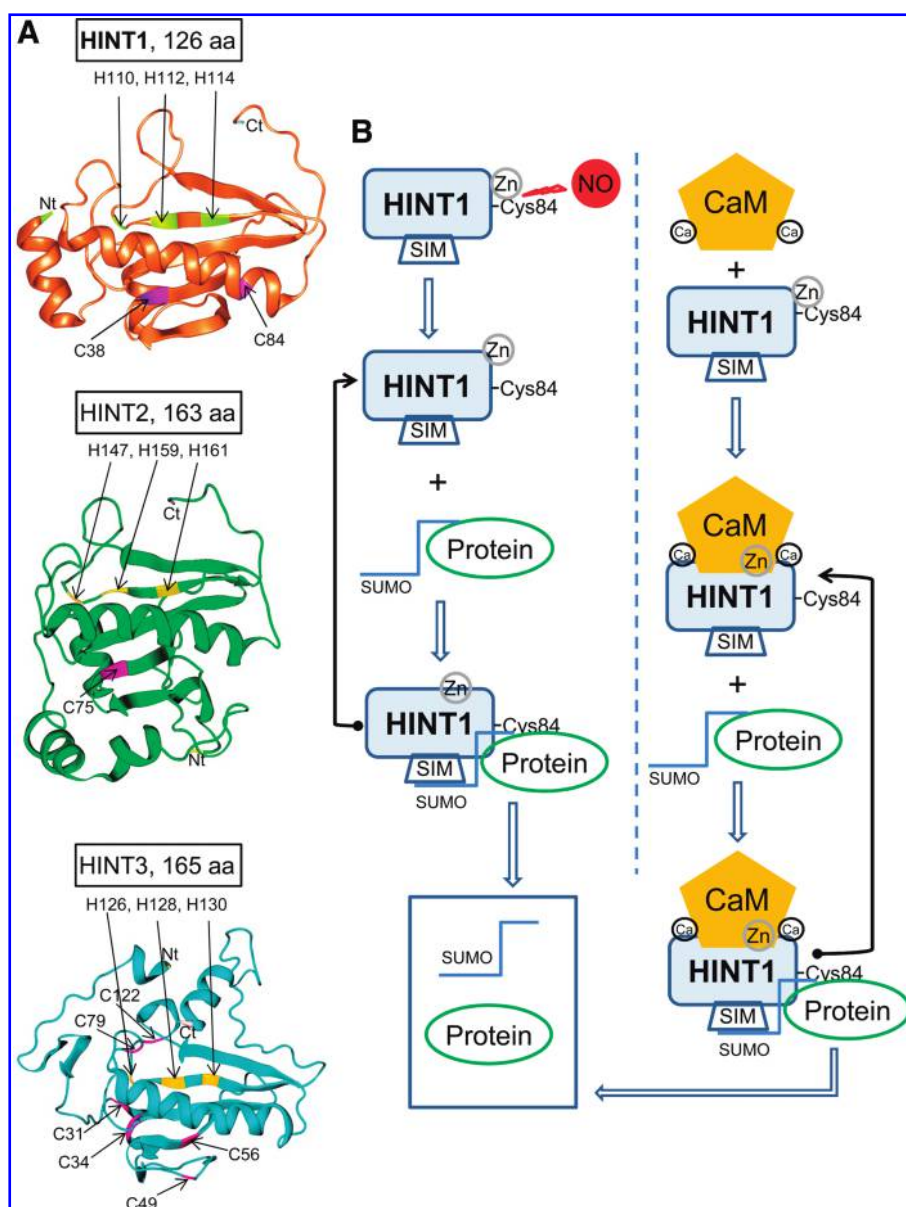
without altering its binding site. Thus, free zinc ions may oppose Ca^{2+} -CaM but not NO in their activation of HINT1 isopeptidase.

HINT1 has emerged as a cysteine protease regulated by zinc ions, CaM, and redox processes (Fig. 10), and this regulation is absent in SENPs or DeSIs. HINT1 shows certain homology with matrix metalloproteinases (MMPs) and caspases in which a critical cysteine co-ordinates a zinc ion in the catalytic site that inhibits the enzyme, thus allowing these proteins to be activated by NO (36, 59). Disruption of the zinc-cysteine interaction activates the MMP by a mechanism known as the cysteine switch. The availability of NO to react with the cysteine thiol to form the S-nitrosylated derivative is facilitated by the colocalization of MMP with nNOS (17). Similarly, HINT1 also colocalizes with nNOS in the MOR environment where HINT1 is associated with RGSZ2-nNOS complexes (18). On MOR activation, G α -GTP subunits bind to the HINT1-bound RGSZ2 protein, provoking nNOS activation and subsequent NO production (48, 50). Thus, as re-

ported for MMP, the proximity of nNOS may facilitate the removal of zinc ions from the HINT1 catalytic Cys84 by NO. The MOR establishes physical interactions with glutamate NMDA calcium ionotropic receptors (42), which activate CaM and nNOS. In this scenario, CaM binding to the HINT1 N-terminal region may remove zinc ions from the catalytic Cys84 and displace desumoylated binding partners, such as RGSZ2 and ICD teneurin1, from their binding to HINT1. Thus, NMDAR activity may provide calcium- and NO-mediated regulation of HINT1 isopeptidase activity.

Initial studies suggested that the linear amino acid sequence containing the HIT was the HINT1 binding zinc site (35). A subsequent study on the HINT1 3D dimeric structure refined the initial idea and proposed His51, His112, and His114 as the best zinc-binding candidates (26), and these histidine residues are mutated in human ARAN-NM. Although HINT1 H112N and H114R mutants were devoid of isopeptidase activity, this function was deregulated in the H51R mutant, suggesting that His51 is essential for the zinc-

FIG. 10. Dual regulation of HINT1 sumoylase activity. (A) The HIT nucleotide-binding protein family. Ribbon representation of the 3D structural similarity between HINT1, HINT2, and HINT3 proteins. The HIT is shown in yellow, and cysteines are shown in purple (Novafold v15; DNASTAR, Inc.). (B) NO produces the S-nitrosylation of cysteine thiol groups and activates HINT1 isopeptidase activity. The reduction in cysteine S-nitrosylated thiol groups, typically via the S-nitrosoglutathione reductase or thioredoxin systems, enables zinc to bind to HINT1 and inhibit its desumoylase activity. Calcium-activated CaM releases zinc inhibitory control on HINT1 isopeptidase activity. Reductions in calcium levels will cause calcium-free inactive CaM to dissociate from HINT1. In this situation, zinc ions may bind to cysteine 84, inhibiting HINT1 sumoylase activity. Color images are available online.



mediated inhibition of HINT1 activity. In zinc metalloenzymes, zinc ions exhibit picomolar to nanomolar affinity when adopting the tetrahedral geometry co-ordinating the sulfur of cysteine, the nitrogen of histidine, the oxygen of aspartate or glutamate, or a combination (31). However, zinc inhibition of caspase-3 is achieved in the mid-nanomolar to low-micromolar range, suggesting that Zn^{2+} binds to a single or a couple of amino acid residues, probably His237 and Cys285, in the catalytic site. Previous studies reported the binding of a single zinc ion per HINT1 molecule with a K_d of $4.3 \mu M$ (35), which suggests that zinc inhibits HINT1 isopeptidase activity by bridging a couple of amino acid residues, probably Cys84 and His51. Thus, the HINT1 catalytic triad may include Cys84 but not Cys38 together with Asp87 and probably His114 as well.

The reported HINT1 purine nucleoside phosphoramidase and adenylate hydrolase activity (8, 11) diminishes in the presence of low-micromolar concentrations of divalent metal ions with a rank order of $Cu^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} \geq Ni^{2+} > Mn^{2+}$, but it is still observed in the presence of chelators such as ethylenediaminetetraacetic acid (53). The isopeptidase activity of HINT1 was also reduced by such a range of divalent metal ion concentrations and with a similar rank order $Cu^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+} > Mn^{2+}$. Alternatively, mid-nanomolar concentrations of the substrate TpAd and of the inhibitor TpGc of HINT1 adenylate hydrolase activity inhibited HINT1 sumoylase activity. These observations suggest that both enzymatic activities share the substrate recognition site and/or the catalytic site on the HINT1 protein. Although HINT1 nucleotide hydrolysis is strongly diminished in the His114 mutant, this activity remains after a single cysteine substitution, C38A or C84A, with the double cysteine mutant exhibiting 1/10th of the WT activity (38). Therefore, this HINT1 function may require the integrity of His114 but is not as dependent on Cys84 as the isopeptidase activity is. To date, no report has described HINT1 purine nucleoside phosphoramidase and adenylate hydrolase activity to be regulated by calcium, CaM, or redox processes. The affinity of zinc for the HINT1 protein is in the low-micromolar concentration range (35), similar to that required to inhibit its adenylate hydrolase activity (53). It is possible that certain protein purification procedures remove zinc from its inhibitory binding to the HINT1 protein, thus releasing this enzymatic activity.

The HINT1 mutant H112N lacks isopeptidase and adenylate hydrolase activity; however, WT HINT1 and the H112N mutant promoted p53-mediated apoptosis when expressed in SW480 and MCF-7 cells (66). This observation may suggest that some signaling features of the HINT1 protein are independent of its enzymatic activity. Nevertheless, it is possible that these functions must be blocked for HINT1 to promote this signaling. HINT1 establishes zinc-dependent associations with proteins such as $PKC\gamma$ and Raf-1 and calcium-dependent interactions with $\sigma 1R$, RGSZ2, and ICD teneurin1 (42, 47, present study), which may, indeed, affect its sumoylase activity. Our *in vitro* assays revealed that the regulatory cytosolic region of the NMDAR NR1 subunit and $\sigma 1R$ abrogated the isopeptidase activity of HINT1, which persisted when HINT1 was bound to MOR, RGSZ2, or ICD teneurin1. This *in vivo* inhibitory regulation of HINT1 desumoylase activity was assessed in brain tissue obtained from mice that received drugs known to disrupt HINT1 interactions with those proteins able to inhibit its isopeptidase function *in vitro*, that is, NMDAR NR1 subunits and $\sigma 1R$ s

(44, 46). The *ex vivo* study confirmed that HINT1 binds to the MOR (42) and that $\sigma 1R$ s or NMDARs blocked HINT1's access to its substrate, sumoylated RGSZ2. The *in vivo* administration of $\sigma 1R$ antagonists S1RA and BD1063 and the NMDAR agonist NMDA facilitated the association of sumoylated RGSZ2 proteins with MOR–HINT1 complexes (42) and probably the recruitment of HINT1 isopeptidase activity as well.

These observations and previous data delineate how HINT1 isopeptidase activity may be regulated in the neural membrane. In the resting state, the HINT1 protein binds to the MOR C terminal cytosolic sequence (18). In this situation, HINT1 may also bind to NR1 subunits of silent NMDARs, interact with $\sigma 1R$ s, or form complexes with desumoylated RGSZ2 and inactive $PKC\gamma$ (1, 44). In the latter scenario, the action of nNOS/NO on RGSZ2 CRD provides zinc ions to couple inactive $PKC\gamma$ to the HINT1 protein (14, 48). Agonist-induced signaling through MORs promotes the separation of $PKC\gamma$ from the MOR–HINT1–RGSZ2 complex and activation of the kinase *via* $G\beta\gamma$ -phospholipase C β -calcium/diacylglycerol. The activity of $PKC\gamma$ in this environment releases RGSZ2–nNOS from the MOR–HINT1 complex, which is now ready to couple with NR1 subunits to regulate the activity of NMDARs. The direct activation of NMDARs or regulators of $\sigma 1R$ s promotes the separation of active NMDARs from MOR–HINT1 complexes (42, 46). In this scenario, HINT1 binds to sumoylated RGSZ2, and the calcium levels provided by NMDAR function activate CaM and nNOS/NO, which then recruit HINT1 isopeptidase. Thus, Ca^{2+} -CaM and NO oppose the inhibitory effect of zinc ions, which are ready to bind to HINT1 Cys84. After the cessation of NMDAR activity, calcium levels diminish and consequently decrease CaM and nNOS activity, and zinc ions can then bind the reduced Cys84 to inhibit HINT1 desumoylase activity.

The interaction of ICD teneurin1 and RGSZ2 with the HINT1 protein may be relevant to the onset of certain diseases. HINT1 facilitates the transportation of these proteins from the plasma membrane to the nucleus to regulate gene transcription. Teneurin1, a protein implicated in Alzheimer's disease, is a transmembrane glycoprotein that is highly expressed in the CNS of mammals, which regulates processes such as the Wnt/ β -catenin transcriptional pathway, neurite outgrowth, axon guidance, fasciculation target recognition, and synaptogenesis (6, 69). Because ICD teneurin1 requires HINT1 to promote gene transcriptional regulation, the impaired isopeptidase activity of human HINT1 mutants may alter ICD teneurin1 regulation of gene expression and contribute to triggering ARAN-NM in humans. Interestingly, targeted disruption of the *HINT1* gene does not promote neuropathy-related phenotypes, at least in mice (52). This finding suggests that human HINT1 mutants alter the function of third-partner proteins, such as those included in this study, and thus cause the disease. Indeed, $\sigma 1R$ is enriched in motoneurons (30), and its human mutations have been implicated in distal hereditary motor neuropathies (49), even in devastating amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (2). HINT1 collaborates with $\sigma 1R$ to regulate the function of glutamate NMDARs (44), and the progression of ALS is delayed by drugs such as riluzole, which diminishes the function of these NMDARs (28). The HINT1-interacting protein RGSZ2 has also been related to different types of cancer, such as lung,

prostate, ovarian, breast, hepatocellular carcinoma, and colorectal cancer (see the section “Introduction”). However, there are no data available on the relevance of the sumoylated RGSZ2 forms in these diseases.

In summary, HINT1 sumoylase activity is inhibited by the binding of zinc ions to Cys84 at the catalytic site and probably to His51 as well. In addition, HINT1's sumoylase activity is inhibited through its interaction with third-partner proteins such as NMDARs and σ 1Rs. After disruption of these inhibitory interactions, HINT1 isopeptidase activity is promoted by zinc removal from Cys84 through Ca^{2+} -CaM and NO. Thus, redox processes and the interaction of certain signaling proteins regulate this newly discovered activity of the HINT1 protein. The human HINT1 mutants reported to cause ARAN-NM all exhibited deficiencies in their sumoylase activity, thus suggesting a role for HINT1 isopeptidase activity in the pathogenesis of this human motor disease.

Materials and Methods

Expression of recombinant proteins

The coding region of murine full-length (1–126) HINT1 (NM_008248.2) and its mutated sequences, HINT2 (NM_026871.1) (1–163), HINT3 (NM_025798.3) (1–165), RGSZ2 (NM_019958.4) (1–210), the ICD region of the Teneurin1 (NM_011855) (residues 2–317), and σ 1R (AF004927) (1–223), were amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction using total RNA isolated from mouse brains as the template. Specific primers containing an upstream *SgfI* restriction site and a downstream *PmeI* restriction site were used, as previously described (44). The PCR products were cloned downstream of the GST coding sequence (for RGSZ2 and σ 1R) or HaloTag coding sequence (for HINT1, HINT2, HINT3, ICD Teneurin 1), and the TEV protease site. All the sequences were confirmed through automated capillary sequencing, and they were identical to the GenBank™ sequences. The vector was introduced into *Escherichia coli* BL21 (KRX #L3002; Promega), and clones were selected on solid medium containing ampicillin. After 3 h of induction at room temperature (RT) (1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside and 0.1% Rhamnose), the cells were collected by centrifugation, and the pellets were maintained at -80°C .

The GST fusion proteins were purified under native conditions on GStrap FF columns (GE#17-5130-01; GE Healthcare); when necessary, the fusion proteins retained were cleaved on the column with ProTEV protease (#V605A; Promega), and further purification was achieved by high-resolution ion exchange (#780-0001 Enrich Q; BioRad) or electroelution of the corresponding gel band (GE 200; Hoefer Scientific Instruments).

The HaloTag fusion proteins were purified under native conditions with HaloLink Resin (G1915; Promega), and they were cleaved in bulk with ProTEV protease (#V605A; Promega); further purification was achieved by high-resolution ion-exchange chromatography (#780-0001 Enrich Q; BioRad). In a set of assays, HINT1 obtained from a commercial source (Abcam plc; #ab87362) was also used.

To preserve the HINT1, enzymatic activity was essential to keep the HINT1 proteins as dissociable monomers, so their storage plays a critical role as these proteins were found to form dimers, tetramers, and even larger oligomers in solution. The multimeric forms of the HINT1 were not disrupted

by disulfide bond reductors or ionic detergents. Thus, for HINT1 WT and its mutated sequences, protein-enriched fractions were concentrated by centrifugation in an Amicon Ultra-0.5 centrifugal filter device (UFC5010BK; Millipore), followed by buffer exchange in PD-10 gel chromatography columns (GE #17-0851-01; GE Healthcare) in a buffer containing 20 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM NaCl, and 1 mM dithiothreitol (DTT). HINT1 was concentrated and stored under an inert Argon atmosphere at -80°C .

Animals, drugs, and metal ions

Male albino CD1 mice, homozygous (σ 1R $^{-/-}$) male sigma receptor knockout mice, backcrossed (N10 generation) onto a CD1 albino genetic background (ENVIGO, Milano, Italy), and homozygous (HINT1 $^{-/-}$) male HINT1 knockout mice with the genetic background from 129 mice were used in this study. The mice were maintained at 22°C on a diurnal 12 h light/dark cycle. Animals were randomly assigned to each experimental group, and the molecular determinations were performed in naïve mice and those that received the drugs. To facilitate selective and straightforward access to their targets, the compounds were injected (4 μL) into the lateral ventricles of mice. Drug doses and animal per group were selected based on previous work (44, 57). All procedures involving mice adhered strictly to the guidelines of the European Community for the Care and Use of Laboratory Animals (Council Directive 86/609/EEC) and Spanish Law (RD53/2013) regulating animal research. All experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Research of CSIC.

The non-competitive inhibitor of HINT1 enzymatic activity TpGc and the HINT1 substrate TpAd were synthesized with iQAC CSIC (Barcelona, Spain). These compounds were initially dissolved in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO), and through serial dilutions, the concentrations used in the study were obtained with a final DMSO concentration of $\sim 0.1\%$. NMDA (#0114) and BD1063 (#0883) were obtained from Tocris Bioscience (Bristol, United Kingdom); 4-[2-[[5-methyl-1-(2-naphthalenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxy]ethyl] morpholine (S1RA) was obtained from Cayman Chemical United States of America (#16279). NO donors: SNAP (Merk Millipore; #487910), NOR-3 (FK409) (Tocris; #3105), Spermine NONOate (Merk Millipore; #567703), and TPEN (Merk Millipore; #616394). Test drugs were dissolved in saline or DMSO when required.

High-purity divalent metal chloride salts were dissolved in water and evaluated on HINT1 sumoylase activity: CuCl_2 (Merck-Millipore; #102739), NiCl_2 (Merck-Millipore; #106717), ZnCl_2 (Sigma; #39059), MnCl_2 (Merck-Millipore; #805930), and MgCl_2 (Sigma; #M8266).

In vitro interactions between recombinant proteins

The recombinant HINT proteins (200 nM) or HINT1 mutants were incubated either with Sepharose 4B (GE #17-0120-01; negative control) or together with the immobilized proteins: CaM-agarose 4B (GE Healthcare, GE #17-0529-01), SUMO1-agarose (Boston Biochem; #UL-740), or SUMO2-agarose (Boston Biochem; #UL-755) in 300 μL of a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 0.2% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) in the presence of 2.5 mM CaCl_2 and mixed by rotation for 30 min at RT. After incubation, the pellets were

recovered by centrifugation, washed thrice in the presence of 2.5 mM CaCl₂, solubilized in 2×Laemmli buffer, and analyzed by Western blotting.

The interactions between GST-RanGAP1 (100 nM) (Enzo Lifescience; #BML-UW9755), GST-SP100 (100 nM) (Enzo Lifescience; #BML-UW9825), and HINT1 (200 nM) were studied. In another set of assays, the interactions between GST-HINT1 (100 nM) and RGSZ2 (200 nM) and ICD teneurin1 (200 nM) were analyzed. The proteins were incubated alone (negative control) or together with the GST-tagged protein in 300 μL of a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2% CHAPS, and 2.5 mM CaCl₂ and mixed by rotation for 30 min at RT. After incubation, 40 μL glutathione sepharose (GE Healthcare; GE#17-0756-01) was added, and the pellets obtained by centrifugation were washed three times, solubilized in 2×Laemmli buffer, and analyzed by Western blotting.

In vitro sumoylation and desumoylation assays

In vitro sumoylation assays were performed by using the kit provided by Enzo Life Sciences (#BML-UW8955). Briefly, in a 20-μL reaction, 1 μM purified murine recombinant RGSZ2, ICD teneurin1, or GST-RanGAP1 (positive control) was incubated with a reaction mixture containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 40 mM NaCl, 10 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 100 nM SUMO E1, 2 μM SUMO E2, and 50 μM SUMO1 for 1 h at 37°C. To improve the isopeptidase activity of HINT1, after sumoylation of the target protein, the 10 mM MgCl₂ buffer was exchanged with the desumoylation buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, and 0.3 mM MgCl₂ by using a centrifugal filter device (Millipore; 10,000 nominal molecular weight limit, Amicon Ultra-0.5, #UFC5010BK).

Desumoylation assays were carried out by incubating the sumoylated substrate with 2 μM HINT1 in the presence of 6 μM CaM (208670; Calbiochem) plus 2.5 mM CaCl₂, or in the presence of 100 μM NO donor SNAP. SENP2 (300 nM, #E-710; Boston Biochem) preincubated with 10 mM DTT was used as control of desumoylation. The reactions were performed in a 30-μL reaction for 1 h at 37°C, and they were stopped by adding 2×Laemmli buffer. The samples were separated by sodium dodecyl sulfate (SDS)/polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and analyzed by Western blotting.

Immunoprecipitation and Western blotting

Mice cerebral cortices were obtained and processed to obtain the synaptosomal pellet, and they were used for MOR immunoprecipitation. This procedure has been described elsewhere (13). Briefly, for immunoprecipitation studies, the cortices from eight mice were typically pooled; the assays were repeated at least twice on samples that had received an identical treatment and were collected at the same interval post-administration. The affinity-purified immunoglobulin Gs (IgGs) against the extracellular domains of the MOR second external loop (205–216: MATTKYRQGSID; GenScript Co.) were labeled with biotin (Pierce; #21217 and 21339). The immunocomplexes were recovered and resolved with SDS-PAGE electrophoresis in 10 cm × 10 cm × 1.5 mm gel slabs (7%–14% total acrylamide concentration, 2.6% bisacrylamide cross-linker concentration). Separated proteins were transferred onto 0.2 μm polyvinylidene difluoride

membranes (Bio-Rad; #162-0176) and probed overnight at 6°C with the selected primary antibodies diluted in Tris-buffered saline (TBS; pH 7.7) + 0.05% Tween 20 (TTBS). These proteins were detected by using secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase. The secondary antibodies were directed to either the heavy or light IgG chains of the primary antibodies as needed to preserve the target immunosignal. In parallel gel blots loaded with a fraction of the samples, the immunoprecipitated MORs were detected. Because the secondary antibodies reacted primarily with the IgG light chains of the primary and the accompanying antibodies used for immunoprecipitation of MOR, these signals when needed also provided a loading control for the samples in the gel.

The *in vitro* assays using recombinant proteins did not require immunoprecipitation; thus, IgGs were excluded. In protein interaction studies, cloned proteins such as SUMO and CaM were immobilized through covalent attachment to N-hydroxysuccinimide-activated Sepharose 4 FF, carried GST that was pulled down by using agarose-glutathione. Subsequently, the target recombinant proteins, for example HINT1 and mutants, were coincubated with agarose-immobilized proteins or GST proteins. Then, the agarose containing the protein complexes went through repeated centrifugation-washing cycles. Next, target proteins were detached from agarose-immobilized proteins by using SDS Laemmli buffer, resolved by SDS-PAGE and detected by Western blotting with the appropriate antibodies. Thus, the blot areas containing the corresponding sizes of the cloned target proteins were selected for image capture and analysis. In sumoylation assays, the sumoylated recombinant protein was identified through anti SUMO antibodies and specific anti-target proteins when available, for example RGSZ2 and ICD teneurin1. The effect of HINT1 and SENP on RanGAP1 and RGSZ2 sumoylated proteins is shown. For ICD teneurin1, the bands initially sumoylated are shown.

The Western blot images and antibody binding were visualized by chemiluminescence (Bio-Rad; #170-5061) and recorded by using an ImageQuant™ LAS 500 (GE). For each blot, the area containing the target protein was typically selected (with the exception of *ex vivo* assays, which included a wider area of protein sizes). The device automatically captures the selected area and calculates the optimal exposure time to provide the highest possible signal to enable accurate quantification of the sample. Protein immunosignals were measured by using the area of the strongest signal of each studied group of samples (average optical density of the pixels within the object area/mm²; AlphaEase FC software). The gray values of the means were then normalized within the 8 bit/256 gray levels [(256 – computed value)/computed value].

Antibodies

The primary antibody to detect immunoprecipitated receptor was: anti-MOR Ct aa 387–398 (GenScript Co.). Other primary antibodies used in this study were: anti-CaM (Millipore; #05-173), anti-GST (Cell Signaling; #2622), anti-HINT2 (Abnova; #H00084681-01), anti-RGSZ2(1) (Thermo Scientific; #PA1-25695), anti-RGSZ2(2) (aa 192-215; GenScript Co.) (14), anti-teneurin1 (Novus Biologicals; #NBP2-41315), anti-σ1R (Invitrogen; #42-3300), anti-SUMO1 (Enzo; #BML-PW9460), and anti-SUMO-2/3 (Enzo; #BML-PW9465). The anti-HINT1 antibody was raised in rabbits

(Immunostep) against the peptide sequence GYRMVVNE-GADGGG (93–106). All primary antibodies were detected by using the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies.

Statistical analysis

All graphs and statistical analyses were generated and performed by using the SigmaPlot/SigmaStat v.14 package (SPSS Science Software; Erkrath). Experiments were performed in triplicate on separate experimental days. Data using recombinant proteins and from *ex vivo* protein determinations were analyzed by using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Holm-Sidak multiple-comparisons test. Data from divalent cation effects were analyzed by using two-way ANOVA, with ion and concentration as main factors. All experiments produced a significant interaction; thus, the follow-up analysis involved one-way ANOVA followed by Holm-Sidak multiple-comparisons test. The effect of TpGc and of TpAd on HINT1 isopeptidase activity was analyzed by non-linear regression-ligand binding-one site competition. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

Acknowledgments

This research was supported by MICINN Plan Nacional I+D+i [grant number RT 2018-093677-B-100]. Elsa Cortés-Montero was supported by a Fellowship from MECO [FPU 15/02356]. The authors would like to thank Gabriela de Alba and Veronica Merino for their excellent technical assistance. They also appreciate the advice of the Department of Statistics, Center for Informatics at the Spanish Council for Scientific Research (CSIC).

Author Disclosure Statement

The authors declare that, excluding income received from their primary employer “Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades/CSIC” no financial support or compensation has been received from any individual or corporate entity over the past 3 years for research or professional services and that there are no personal financial holdings that could be perceived as constituting a potential conflict of interest.

Supplementary Material

Supplementary Figure S1
 Supplementary Figure S2
 Supplementary Figure S3
 Supplementary Figure S4
 Supplementary Figure S5
 Supplementary Figure S6
 Supplementary Figure S7
 Supplementary Figure S8
 Supplementary Figure S9
 Supplementary Figure S10
 Supplementary Table S1

References

- Ajit SK, Ramineni S, Edris W, Hunt RA, Hum WT, Hepler JR, and Young KH. RGSZ1 interacts with protein kinase C interacting protein PKCI-1 and modulates mu opioid receptor signaling. *Cell Signal* 19: 723–730, 2007.
- Al-Saif A, Al-Mohanna F, and Bohlega S. A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 70: 913–919, 2011.
- Bardaweel S, Ghosh B, Chou TF, Sadowsky MJ, and Wagner CR. *E. coli* histidine triad nucleotide binding protein 1 (ecHinT) is a catalytic regulator of D-alanine dehydrogenase (DadA) activity in vivo. *PLoS One* 6: e20897, 2011.
- Bardaweel SK, Ghosh B, and Wagner CR. Synthesis and evaluation of potential inhibitors of human and *Escherichia coli* histidine triad nucleotide binding proteins. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 558–560, 2012.
- Barrett AJ and Rawlings ND. Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol Chem* 382: 727–733, 2001.
- Bastias-Candia S, Braidy N, Zolezzi JM, and Inestrosa NC. Teneurins and Alzheimer’s disease: a suggestive role for a unique family of proteins. *Med Hypotheses* 84: 402–407, 2015.
- Bodle CR, Mackie DI, and Roman DL. RGS17: an emerging therapeutic target for lung and prostate cancers. *Future Med Chem* 5: 995–1007, 2013.
- Brenner C. Hint, Fhit, and GalT: function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases. *Biochemistry* 41: 9003–9014, 2002.
- Buller AR and Townsend CA. Intrinsic evolutionary constraints on protease structure, enzyme acylation, and the identity of the catalytic triad. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E653–E661, 2013.
- Cen B, Li H, and Weinstein IB. Histidine triad nucleotide-binding protein 1 up-regulates cellular levels of p27KIP1 by targeting ScfSKP2 ubiquitin ligase and Src. *J Biol Chem* 284: 5265–5276, 2009.
- Chou TF and Wagner CR. Lysyl-tRNA synthetase-generated lysyl-adenylate is a substrate for histidine triad nucleotide binding proteins. *J Biol Chem* 282: 4719–4727, 2007.
- Drag M and Salvesen GS. DeSUMOylating enzymes—SENPs. *IUBMB Life* 60: 734–742, 2008.
- Garzón J, Rodríguez-Muñoz M, López-Fando A, and Sánchez-Blázquez P. Activation of mu-opioid receptors transfers control of Galpha subunits to the regulator of G-protein signaling RGS9-2: role in receptor desensitization. *J Biol Chem* 280: 8951–8960, 2005.
- Garzón J, Rodríguez-Muñoz M, Vicente-Sánchez A, Bailón C, Martínez-Murillo R, and Sánchez-Blázquez P. RGSZ2 binds to the neural nitric oxide synthase PDZ domain to regulate mu-opioid receptor-mediated potentiation of the N-methyl-D-aspartate receptor-calmodulin-dependent protein kinase II pathway. *Antioxid Redox Signal* 15: 873–887, 2011.
- Grabarek Z. Insights into modulation of calcium signaling by magnesium in calmodulin, troponin C and related EF-hand proteins. *Biochim Biophys Acta* 1813: 913–921, 2011.
- Grigoletto A, Lestienne P, and Rosenbaum J. The multifaceted proteins Reptin and Pontin as major players in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1815: 147–157, 2011.
- Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, and Lipton SA. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 297: 1186–1190, 2002.
- Guang W, Wang H, Su T, Weinstein IB, and Wang JB. Role of mPKCI, a novel mu-opioid receptor interactive protein, in receptor desensitization, phosphorylation, and

- morphine-induced analgesia. *Mol Pharmacol* 66: 1285–1292, 2004.
19. Hayes MP and Roman DL. Regulator of G protein signaling 17 as a negative modulator of GPCR signaling in multiple human cancers. *AAPS J* 18: 550–559, 2016.
 20. Hickey CM, Wilson NR, and Hochstrasser M. Function and regulation of SUMO proteases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 755–766, 2012.
 21. Huebner K, Saldívar JC, Sun J, Shibata H, and Druck T. Hits, Fhits and Nits: beyond enzymatic function. *Adv Enzyme Regul* 51: 208–217, 2011.
 22. Krakowiak A, Kaczmarek R, Baraniak J, Wiczorek M, and Stec WJ. Stereochemistry of rHint1 hydrolase assisted cleavage of P-N bond in nucleoside 5'-O-phosphoramidothioates. *Chem Commun (Camb)* 2163–2165, 2007.
 23. Kumar V, Chichili VP, Tang X, and Sivaraman J. A novel trans conformation of ligand-free calmodulin. *PLoS One* 8: e54834, 2013.
 24. Li H, Balajee AS, Su T, Cen B, Hei TK, and Weinstein IB. The HINT1 tumor suppressor regulates both gamma-H2AX and ATM in response to DNA damage. *J Cell Biol* 183: 253–265, 2008.
 25. Li H, Zhang Y, Su T, Santella RM, and Weinstein IB. Hint1 is a haplo-insufficient tumor suppressor in mice. *Oncogene* 25: 713–721, 2006.
 26. Lima CD, Klein MG, Weinstein IB, and Hendrickson WA. Three-dimensional structure of human protein kinase C interacting protein 1, a member of the HIT family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5357–5362, 1996.
 27. Liu Q, Puche AC, and Wang JB. Distribution and expression of protein kinase C interactive protein (PKCI/HINT1) in mouse central nervous system (CNS). *Neurochem Res* 33: 1263–1276, 2008.
 28. Lu H, Le WD, Xie YY, and Wang XP. Current therapy of drugs in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Neuropharmacol* 14: 314–321, 2016.
 29. Maret W. Zinc coordination environments in proteins as redox sensors and signal transducers. *Antioxid Redox Signal* 8: 1419–1441, 2006.
 30. Mavlyutov TA, Epstein ML, Andersen KA, Ziskind-Conhaim L, and Ruoho AE. The sigma-1 receptor is enriched in postsynaptic sites of C-terminals in mouse motoneurons. An anatomical and behavioral study. *Neuroscience* 167: 247–255, 2010.
 31. McCall KA, Huang C, and Fierke CA. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr* 130: 1437S–1446S, 2000.
 32. McDonald JR, Groschel-Stewart U, and Walsh MP. Properties and distribution of the protein inhibitor (Mr 17,000) of protein kinase C. *Biochem J* 242: 695–705, 1987.
 33. McDonald JR and Walsh MP. Ca²⁺-binding proteins from bovine brain including a potent inhibitor of protein kinase C. *Biochem J* 232: 559–567, 1985.
 34. Meng L, Fu J, Lv H, Zhang W, Wang Z, and Yuan Y. Novel mutations in HINT1 gene cause autosomal recessive axonal neuropathy with neuromyotonia in two cases of sensorimotor neuropathy and one case of motor neuropathy. *Neuromuscul Disord* 28: 646–651, 2018.
 35. Mozier NM, Walsh MP, and Pearson JD. Characterization of a novel zinc binding site of protein kinase C inhibitor-1. *FEBS Lett* 279: 14–18, 1991.
 36. Nelson KK and Melendez JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic Biol Med* 37: 768–784, 2004.
 37. Nishida T, Kaneko F, Kitagawa M, and Yasuda H. Characterization of a novel mammalian SUMO-1/Smt3-specific isopeptidase, a homologue of rat axam, which is an axin-binding protein promoting beta-catenin degradation. *J Biol Chem* 276: 39060–39066, 2001.
 38. Ozga M, Dolot R, Janicka M, Kaczmarek R, and Krakowiak A. Histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT-1) phosphoramidase transforms nucleoside 5'-O-phosphorothioates to nucleoside 5'-O-phosphates. *J Biol Chem* 285: 40809–40818, 2010.
 39. Pearson JD, DeWald DB, Mathews WR, Mozier NM, Zurcher-Neely HA, Heinrichson RL, Morris MA, McCubbin WD, McDonald JR, Fraser ED, Vogel HJ, Kay CM, and Walsh MP. Amino acid sequence and characterization of a protein inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 265: 4583–4591, 1990.
 40. Peeters K, Chamova T, Tournev I, and Jordanova A. Axonal neuropathy with neuromyotonia: there is a HINT. *Brain* 140: 868–877, 2017.
 41. Rodríguez-Muñoz M, Bermúdez D, Sánchez-Blázquez P, and Garzón J. Sumoylated RGS-Rz proteins act as scaffolds for Mu-opioid receptors and G-protein complexes in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* 32: 842–850, 2007.
 42. Rodríguez-Muñoz M, Cortés-Montero E, Pozo-Rodríguez A, Sánchez-Blázquez P, and Garzón-Niño J. The ON:OFF switch, sigma1R-HINT1 protein, controls GPCR-NMDA receptor cross-regulation: implications in neurological disorders. *Oncotarget* 6: 35458–35477, 2015.
 43. Rodríguez-Muñoz M and Garzón J. Nitric oxide and zinc-mediated protein assemblies involved in mu opioid receptor signaling. *Mol Neurobiol* 48: 769–782, 2013.
 44. Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Herrero-Labrador R, Martínez-Murillo R, Merlos M, Vela JM, and Garzón J. The sigma1 receptor engages the redox-regulated HINT1 protein to bring opioid analgesia under NMDA receptor negative control. *Antioxid Redox Signal* 22: 799–818, 2015.
 45. Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Vicente-Sánchez A, Bailón C, Martín-Aznar B, and Garzón J. The histidine triad nucleotide-binding protein 1 supports mu-opioid receptor-glutamate NMDA receptor cross-regulation. *Cell Mol Life Sci* 68: 2933–2949, 2011.
 46. Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Vicente-Sánchez A, Berrocoso E, and Garzón J. The mu-opioid receptor and the NMDA receptor associate in PAG neurons: implications in pain control. *Neuropsychopharmacology* 37: 338–349, 2012.
 47. Rodríguez-Muñoz M, Torre-Madrid E, Sánchez-Blázquez P, and Garzón J. NO-released zinc supports the simultaneous binding of Raf-1 and PKCgamma cysteine-rich domains to HINT1 protein at the mu-opioid receptor. *Antioxid Redox Signal* 14: 2413–2425, 2011.
 48. Rodríguez-Muñoz M, Torre-Madrid E, Sánchez-Blázquez P, Wang JB, and Garzón J. NMDAR-nNOS generated zinc recruits PKCgamma to the HINT1-RGS17 complex bound to the C terminus of Mu-opioid receptors. *Cell Signal* 20: 1855–1864, 2008.
 49. Rossor AM, Kalmar B, Greensmith L, and Reilly MM. The distal hereditary motor neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83: 6–14, 2012.
 50. Sánchez-Blázquez P, Rodríguez-Muñoz M, Bailón C, and Garzón J. GPCRs promote the release of zinc ions mediated by nNOS/NO and the redox transducer RGS22 protein. *Antioxid Redox Signal* 17: 1163–1177, 2012.

51. Scholer J, Ferralli J, Thiry S, and Chiquet-Ehrismann R. The intracellular domain of teneurin-1 induces the activity of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) by binding to transcriptional repressor HINT1. *J Biol Chem* 290: 8154–8165, 2015.
52. Seburn KL, Morelli KH, Jordanova A, and Burgess RW. Lack of neuropathy-related phenotypes in hint1 knockout mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 73: 693–701, 2014.
53. Shah R, Chou TF, Maize KM, Strom A, Finzel BC, and Wagner CR. Inhibition by divalent metal ions of human histidine triad nucleotide binding protein1 (hHint1), a regulator of opioid analgesia and neuropathic pain. *Biochem Biophys Res Commun* 491: 760–766, 2017.
54. Shah RM, Maize KM, West HT, Strom AM, Finzel BC, and Wagner CR. Structure and functional characterization of human histidine triad nucleotide-binding protein 1 mutations associated with inherited axonal neuropathy with neuromyotonia. *J Mol Biol* 430: 2709–2721, 2018.
55. Shahani N and Sawa A. Nitric oxide signaling and nitrosative stress in neurons: role for s-nitrosylation. *Antioxid Redox Signal* 14: 1493–1504, 2011.
56. Shin EJ, Shin HM, Nam E, Kim WS, Kim JH, Oh BH, and Yun Y. DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease. *EMBO Rep* 13: 339–346, 2012.
57. Su T, Suzui M, Wang L, Lin CS, Xing WQ, and Weinstein IB. Deletion of histidine triad nucleotide-binding protein 1/PKC-interacting protein in mice enhances cell growth and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7824–7829, 2003.
58. Suh HY, Kim JH, Woo JS, Ku B, Shin EJ, Yun Y, and Oh BH. Crystal structure of DeSI-1, a novel deSUMOylase belonging to a putative isopeptidase superfamily. *Proteins* 80: 2099–2104, 2012.
59. Tyagi SC, Kumar S, and Borders S. Reduction-oxidation (redox) state regulation of extracellular matrix metalloproteinases and tissue inhibitors in cardiac normal and transformed fibroblast cells. *J Cell Biochem* 61: 139–151, 1996.
60. Wang L, Li H, Zhang Y, Santella RM, and Weinstein IB. HINT1 inhibits beta-catenin/TCF4, USF2 and NFkappaB activity in human hepatoma cells. *Int J Cancer* 124: 1526–1534, 2009.
61. Wang L, Zhang Y, Li H, Xu Z, Santella RM, and Weinstein IB. Hint1 inhibits growth and activator protein-1 activity in human colon cancer cells. *Cancer Res* 67: 4700–4708, 2007.
62. Wang Z, Lin J, Qiao K, Cai S, Zhang VW, Zhao C, and Lu J. Novel mutations in HINT1 gene cause the autosomal recessive axonal neuropathy with neuromyotonia. *Eur J Med Genet* 62: 190–194, 2019.
63. Warren JT, Guo Q, and Tang WJ. A 1.3-Å structure of zinc-bound N-terminal domain of calmodulin elucidates potential early ion-binding step. *J Mol Biol* 374: 517–527, 2007.
64. Wei X, Zhou J, Hong L, Xu Z, Zhao H, Wu X, and Chen J. Hint1 expression inhibits proliferation and promotes radiosensitivity of human SGC7901 gastric cancer cells. *Oncol Lett* 16: 2135–2142, 2018.
65. Weiske J and Huber O. The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF-beta-catenin-mediated transcription. *J Cell Sci* 118: 3117–3129, 2005.
66. Weiske J and Huber O. The histidine triad protein Hint1 triggers apoptosis independent of its enzymatic activity. *J Biol Chem* 281: 27356–27366, 2006.
67. Xue Y, Liu Z, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X, and Ren J. GPS-SNO: computational prediction of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm. *PLoS One* 5: e11290, 2010.
68. Yap KL, Kim J, Truong K, Sherman M, Yuan T, and Ikura M. Calmodulin target database. *J Struct Funct Genomics* 1: 8–14, 2000.
69. Young TR and Leamey CA. Teneurins: important regulators of neural circuitry. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 990–993, 2009.
70. Zhang YJ, Li H, Wu HC, Shen J, Wang L, Yu MW, Lee PH, Bernard WI, and Santella RM. Silencing of Hint1, a novel tumor suppressor gene, by promoter hypermethylation in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 275: 277–284, 2009.
71. Zhao Q, Xie Y, Zheng Y, Jiang S, Liu W, Mu W, Liu Z, Zhao Y, Xue Y, and Ren J. GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic Acids Res* 42: W325–W330, 2014.
72. Zheng H, Chruszcz M, Lasota P, Lebioda L, and Minor W. Data mining of metal ion environments present in protein structures. *J Inorg Biochem* 102: 1765–1776, 2008.
73. Zimon M, Baets J, Almeida-Souza L, De VE, Nikodinovic J, Parman Y, Battaloglu E, Matur Z, Guergueltcheva V, Tournev I, Auer-Grumbach M, De RP, Petersen BS, Muller T, Fransen E, Van DP, Loscher WN, Barisic N, Mitrovic Z, Previtali SC, Topaloglu H, Bernert G, Beleza-Meireles A, Todorovic S, Savic-Pavicevic D, Ishpekova B, Lechner S, Peeters K, Ooms T, Hahn AF, Zuchner S, Timmerman V, Van DP, Rasic VM, Janecke AR, De JP, and Jordanova A. Loss-of-function mutations in HINT1 cause axonal neuropathy with neuromyotonia. *Nat Genet* 44: 1080–1083, 2012.

Address correspondence to:

Prof. Javier Garzón

Instituto Cajal

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Avenida Doctor Arce 37

Madrid 28002

Spain

E-mail: jgarzon@cajal.csic.es

Date of first submission to ARS Central, January 15, 2019; date of final revised submission, May 6, 2019; date of acceptance, May 10, 2019.

Abbreviations Used

3D = three-dimensional

ALS = amyotrophic lateral sclerosis

ANOVA = analysis of variance

ARAN-NM = autosomal recessive axonal neuropathy with neuromyotonia

BME = β -mercaptoethanol

CaM = calmodulin

CNS = central nervous system

CRD = cysteine-rich domain

Abbreviations Used (Continued)

DeSI = desumoylating isopeptidase
DMSO = dimethyl sulfoxide
GPCR = G protein-coupled receptor
GST = glutathione *S*-transferase
HINT1 = histidine triad nucleotide-binding protein 1
HIT = histidine triad
ICD = intracellular domain
icv = intracerebroventricular
IgG = immunoglobulin G
MMP = matrix metalloproteinase
MOR = mu-opioid receptor
NMDA = *N*-methyl-*D*-aspartate
NMDAR = *N*-methyl-*D*-aspartate receptor
nNOS = neural nitric oxide synthase
NO = nitric oxide
NOR-3 = (2*E*,3*E*)-4-ethyl-2-(hydroxyimino)-5-nitro-3-hexeneamide

PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis
PKC = protein kinase C
RanGAP1 = Ran GTPase-activating protein 1
RGSZ2 = regulator of G protein signaling 17 (Z2)
RT = room temperature
SDS = sodium dodecyl sulfate
SE = standard error
SENP = sentrin-specific protease
SIM = SUMO-interacting motif
SNAP = *S*-Nitroso-*N*-acetyl-*D,L*-penicillamine
SUMO = small ubiquitin-like modifier
TBS = Tris-buffered saline
TpAd = phosphoramidate tryptamine AMP
TPEN = *N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylmethyl) ethylenediamine
TpGc = guanosine-5'-tryptamine carbamate
WT = wild type



Ligands Exert Biased Activity to Regulate Sigma 1 Receptor Interactions With Cationic TRPA1, TRPV1, and TRPM8 Channels

Elsa Cortés-Montero¹, Pilar Sánchez-Blázquez¹, Yara Onetti¹, Manuel Merlos² and Javier Garzón^{1*}

¹ Laboratory of Neuropharmacology, Department of Translational Neuroscience, Cajal Institute, CSIC, Madrid, Spain, ² Drug Discovery & Preclinical Development, Esteve, Barcelona, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Ebru Aydar,
University College London,
United Kingdom

Reviewed by:

Sudarshan Rajagopal,
Duke University Health System,
United States
Shelley J. Russek,
Boston University, United States

*Correspondence:

Javier Garzón
jgarzon@cajal.csic.es

Specialty section:

This article was submitted to
Experimental Pharmacology
and Drug Discovery,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 05 December 2018

Accepted: 17 May 2019

Published: 12 June 2019

Citation:

Cortés-Montero E,
Sánchez-Blázquez P, Onetti Y,
Merlos M and Garzón J (2019)
Ligands Exert Biased Activity
to Regulate Sigma 1 Receptor
Interactions With Cationic TRPA1,
TRPV1 and TRPM8 Channels.
Front. Pharmacol. 10:634.
doi: 10.3389/fphar.2019.00634

The sigma 1 receptor (σ 1R) and the mu-opioid receptor (MOR) regulate the transient receptor potential (TRP) V1 calcium channel. A series of proteins are involved in the cross-regulation between MORs and calcium channels like the glutamate *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR), including the histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1), calmodulin (CaM), and the σ 1R. Thus, we assessed whether similar mechanisms also apply to the neural TRP ankyrin member 1 (TRPA1), TRP vanilloid member 1 (TRPV1), and TRP melastatin member 8 (TRPM8). Our results indicate that σ 1R and CaM bound directly to cytosolic regions of these TRPs, and this binding increased in the presence of calcium. By contrast, the association of HINT1 with these TRPs was moderately dependent on calcium. The σ 1R always competed with CaM for binding to the TRPs, except for its binding to the TRPA1 C-terminal where σ 1R binding cooperated with that of CaM. However, σ 1R dampened HINT1 binding to the TRPA1 N-terminal. When the effect of σ 1R ligands was addressed, the σ 1R agonists PRE084 and pregnenolone sulfate enhanced the association of the σ 1R with the TRPM8 N-terminal and TRPV1 C-terminal in the presence of physiological calcium, as seen for the σ 1R–NMDAR interactions. However, these agonists dampened σ 1R binding to the TRPA1 and TRPV1 N-terminal domains, and also to the TRPA1 C-terminal, as seen for σ 1R–binding immunoglobulin protein (BiP) interactions in the endoplasmic reticulum (ER). By contrast, the σ 1R antagonists progesterone and S1RA reduced the association of σ 1R with TRPA1 and TRPV1 C-terminal regions, as seen for the σ 1R–NMDAR interactions. Conversely, they enhanced the σ 1R interaction with the TRPA1 N-terminal, as seen for σ 1R–BiP interactions, whereas they barely affected the association of σ 1R with the TRPV1 N-terminal. Thus, depending on the calcium channel and the cytosolic region examined, the σ 1R agonists pregnenolone sulfate and PRE084 opposed or collaborated with the σ 1R antagonists progesterone and S1RA to disrupt or promote such interactions. Through the use of cloned cytosolic regions of selected TRP calcium channels, we were able to demonstrate that σ 1R ligands exhibit biased activity to regulate particular σ 1R interactions with other

proteins. Since σ 1Rs are implicated in essential physiological processes, exploiting such ligand biases may represent a means to develop more selective and efficacious pharmacological interventions.

Keywords: type 1 sigma receptor, transient receptor potential ankyrin member 1, transient receptor potential melastatin member 8, transient receptor potential vanilloid member 1, calmodulin, histidine triad nucleotide-binding protein 1, ligand bias, *N*-methyl-D-aspartate receptor

INTRODUCTION

The sigma 1 receptor (σ 1R) is a 223-amino-acid polypeptide that is widely distributed in different tissues and cell compartments. In nervous tissue, the σ 1R is located in areas implicated in nociception and pain control, such as the spinal cord ganglia, substantia gelatinosa of the dorsal horn, and brainstem (Kitaichi et al., 2000; Su et al., 2010). Initially, the σ 1, mu, and kappa receptors in the neural plasma membrane were pharmacologically classified as opioid receptors (Martin et al., 1976). However, the absence of a G-protein-coupled receptor (GPCR) structure and regulated transduction distanced the σ 1R from the opioid receptor family (Su et al., 1988; Su et al., 2010). Nevertheless, the σ 1R maintains a relationship with the opioid system, where it exerts a tonic anti-opioid effect (Mei and Pasternak, 2002) and modulates the activity-induced sensitization of nociceptive pathways (Cobos et al., 2008; Maurice and Su, 2009; Diaz et al., 2009). Thus, certain σ 1R ligands enhance the antinociceptive effects of clinically relevant mu-opioid receptor (MOR) opioids such as morphine, fentanyl, oxycodone, codeine, buprenorphine, and tramadol (Mei and Pasternak, 2002; Diaz et al., 2009; Sánchez-Fernández et al., 2014). However, although other σ 1R ligands do not alter opioid-induced analgesia, they dampen antagonist-mediated effects. Thus, the σ 1R ligands that enhance MOR analgesia are referred to as antagonists, and those that reduce opioid analgesia and/or oppose the effects of antagonists are classified as agonists.

Under normal conditions, σ 1R antagonists do not alter mechanical or thermal thresholds but instead decrease the perception of pain caused by nociceptive sensitization or by pathological states, such as neuropathy, inflammation, or ischemic pain (Kim et al., 2006; Roh et al., 2008; Romero et al., 2012). Recent research has revealed the presence of σ 1Rs in the MOR environment. The cytosolic C-terminus of MOR binds to the histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) protein, facilitating the interactions of the σ 1R and glutamate *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) with the MOR (Rodríguez-Muñoz et al., 2015a). In this context, the σ 1R cooperates with the HINT1 protein to bring the NMDAR under control of the MOR (Rodríguez-Muñoz et al., 2015b). Indeed, activation of the MOR promotes calcium permeation through the NMDAR, which is regulated by the competitive binding of the σ 1R and calmodulin (CaM) to the regulatory cytosolic C1 region of the NMDAR NR1 subunit. Upon σ 1R depletion, HINT1 also reduces the inhibitory binding of calcium-activated CaM to the NMDAR NR1 subunit. Therefore, the MOR activates and regulates the function of ionotropic NMDAR calcium channels through the interactions between σ 1R, HINT1, and CaM where the calcium-dependent

binding of σ 1Rs to NMDARs can predominate over the interactions with CaM and HINT1. This observation prompted us to investigate whether other calcium channels may also be regulated by these σ 1R-mediated mechanisms.

Different classes of channels in the ER and plasma membrane dynamically control intracellular calcium levels. In the present study, we focus on the transient receptor potential (TRP) channel family, homotetrameric calcium channels with variable cytosolic N- and C-terminal regions that contain diverse regulatory protein binding domains and motifs (Owsianik et al., 2006). CaM binds to the cytosolic N- and C-terminal regions of TRPV1 in a calcium-dependent manner (Numazaki et al., 2003; Rosenbaum et al., 2004), as well as to the C-terminus of TRPA1 (Hasan et al., 2017). In fact, by modulating the gating of the calcium influx, CaM participates in the mechanism regulating TRP activity (Numazaki et al., 2003; Lishko et al., 2007; Sarria et al., 2011; Hasan et al., 2017). In addition, pharmacological interventions targeting σ 1R alter TRPV1 expression, with σ 1R antagonists downregulating TRPV1 channels in the plasma membrane of sensory neurons (Ortiz-Renteria et al., 2018). Moreover, MOR and TRPV1 channels are co-precipitated when exogenously expressed in cultured cells (Scherer et al., 2017). While nerve damage provoked by peripheral inflammation enhances TRPA1 levels in dorsal root ganglia (DRG) neurons (Obata et al., 2005), TRPV1 levels increase in undamaged sensory connections (Hudson et al., 2001), facilitating the transmission of nociceptive information and thereby contributing to the resulting pain response. Thus, similar to NMDARs, TRP channels play roles in several pain-related pathological conditions, including inflammatory, neuropathic, visceral, and dental pain, as well as in pain associated with cancer (Patapoutian et al., 2009; Julius, 2013; Mickle et al., 2015). Evidence for these roles has mainly been obtained using specific antagonists of individual nociceptive TRP channels in animal models of pain-related pathologies, such as by inducing these pathologies in mice through the genetic deletion/alteration of individual nociceptive TRP channels (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000; Katsura et al., 2006). These studies have led to the development of a new generation of analgesics that target the TRP sensors for heat, cold, and irritants (Kaneko and Szallasi, 2014).

Three TRPs belonging to different subfamilies and expressed at the spinal level and in the brain fulfilled our criteria to be included in a comparative study with the neural NMDAR. The TRP ankyrin member 1 (TRPA1), TRP vanilloid member 1 (TRPV1), and TRP melastatin member 8 (TRPM8) belong to the so-called thermo TRP channels that participate in detecting temperature changes and integrating different noxious stimuli (Julius, 2013). TRPA1 is a non-selective calcium channel activated by multiple stimuli,

including harmful cold temperatures, acids, and numerous chemical pollutants (Jordt et al., 2004). The TRPM8 channel plays a physiological role in detecting low temperature (10–33°C), and it is over-expressed in sensory neurons after nerve injury or inflammation; TRPM8 also participates in cold allodynia and hyperalgesia (Xing et al., 2007). TRPV1 is also a non-selective calcium channel that is activated by noxious temperatures (>43°C), an acidic pH, and vanilloid compounds. TRPV1 expression is upregulated in response to acute inflammation (Camprubi-Robles et al., 2009) and in conditions of chronic pain, and the activity of this TRP is potentiated by pro-algetic mediators released during inflammation and tissue injury (Huang et al., 2006). In addition, TRPA1 receptors are coexpressed with TRPV1 channels in C-fiber sensory neurons (Fajardo et al., 2008), and they seem to fulfill crucial roles in neuronal and nonneuronal neuropathic pain.

Accordingly, we addressed whether the cloned N- and C-terminal cytosolic regions of these TRP channels participate in direct and calcium-dependent interactions with the σ 1R and the MOR-related HINT1 protein. Because calcium-dependent binding of CaM to cytosolic regions of these TRPs has previously been mapped, we addressed its possible interference in the interaction with σ 1Rs. Given the differences that ligands exhibit on the interactions of σ 1Rs with BiP in the ER and with NR1 subunits of the NMDAR, we also analyzed their profiles in the interactions of σ 1Rs with the cytosolic regions of the TRPs selected. We observed that σ 1R interacts with the N- or C-terminus of these TRPs in a calcium-dependent manner, and most relevantly, σ 1R ligands exhibit a biased activity to disrupt or promote the interaction of σ 1Rs with the TRP domains.

MATERIALS AND METHODS

Recombinant Protein Expression

The coding region of the full-length murine σ 1R (AF004927), HINT1 (NM_008248), and the N- and C-terminal regions of TRPA1 (NP_808449; residues 1–721 and 961–1125), TRPV1 (NP_542437; residues 1–433 and 680–839), and TRPM8 (NP_599013; residues 1–639) were amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using total RNA isolated from the mouse brain as the template. Specific primers containing an upstream Sgf I restriction site and a downstream Pme I restriction site were used, as described previously (Rodríguez-Muñoz et al., 2015b). The PCR products were cloned downstream of the glutathione S-transferase (GST)/HaloTag[®] coding sequence (Flexi[®] Vector, Promega, Spain) and the tobacco etch virus protease (TEV) protease site, and when sequenced, the proteins were identical to the GenBank[™] sequences. The vector was introduced into the *Escherichia coli* BL21 (KRX #L3002, Promega), and clones were selected on solid medium containing ampicillin. After 3 h of induction at room temperature (RT), in the presence of 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and 0.1% Rhamnose, the cells were collected by centrifugation and maintained at –80°C. The fusion proteins were purified under native conditions on GStrap FF columns (#17-5130-01, GE Healthcare, Spain) or with HaloLink Resin (#G1915, Promega). When necessary, the fusion proteins retained were cleaved on the column with ProTEV protease

(#V605A, Promega) and further purification was achieved by high-resolution ion exchange (#780-0001Enrich Q, BioRad, Spain). Sequences were confirmed by automated capillary sequencing. Recombinant calmodulin (CaM, #208694) was purchased at Merck-Millipore (Spain).

In Vitro Interactions Between Recombinant Proteins: Pull-Down of Recombinant Proteins and the Effect of Drugs on the Sigma 1 Receptor–Transient Receptor Potential Interactions

Having demonstrated that the σ 1R and HINT1 do not bind to GST (#Z02039; GenScript Co., USA) (see **Supplementary Figure 1**) (Sánchez-Blázquez et al., 2012), we assessed the association of GST-free σ 1Rs or HINT1 with the GST-tagged TRP cytosolic sequences. The N- and C-terminal domains of TRP were immobilized through covalent attachment to N-Hydroxysuccinimide (NHS)-activated Sepharose 4 fast flow (4FF, #17-0906-01; GE) according to the manufacturer's instructions. Recombinant σ 1R (200 nM) was then incubated with either NHS-blocked Sepharose 4FF (negative control) or with the immobilized TRP sequence (100 nM) in 200 μ L of a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 0.2% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), and in the presence or absence of 3 mM CaCl₂. In pilot assays, we found that the TRP– σ 1R association was maximal after 30 min incubation and that, in this period, the drugs could also promote stable changes in this association. The samples were mixed by rotation for 30 min at RT, and the σ 1Rs bound to TRP-Sepharose 4FF were recovered by centrifugation and washed three times. This protocol was also carried out to assess the TRP-HINT1 or TRP-CaM associations, or the competition between HINT1/CaM and higher concentrations of σ 1R to bind to the TRPs. To study whether the drugs used provoked changes in the TRP– σ 1R association, the agarose-attached TRP– σ 1R complexes were incubated for a further 30 min at RT with rotation in the presence of increasing concentrations of the drugs and in a final reaction volume of 300 μ L of 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 3 mM CaCl₂ and 0.2% CHAPS. In this assay, σ 1R ligands dissolved in aqueous solutions display calcium- and concentration-dependent activity, altering the σ 1R–TRP associations. If an organic solvent was required to incorporate the drug under study, such as dimethyl sulfoxide (DMSO) for pregnenolone sulfate, the DMSO had to remain below 1% in the assay buffer. Agarose pellets containing the bound proteins were obtained by centrifugation, and they were washed thrice in the presence of 3 mM CaCl₂ and then solubilized in 2 \times Laemmli buffer, analyzing the σ 1R/HINT1/CaM content in Western blots. The compounds studied were as follows: progesterone (#P7556, Sigma-Aldrich, Spain), pregnenolone sulfate (#P162, Sigma-Aldrich), S1RA (#16279, Cayman Chemical, USA), and PRE084 (#0589, Tocris Bioscience, UK) (see **Supplementary Figure 2**).

The σ 1R/HINT1/CaM bound to the Sepharose-TRP sequences were resolved with Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in 4–12% Bis-Tris gels (#NP0341, Invitrogen, Fisher Scientific, Spain), with 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid SDS (ME SDS) as the running buffer (#NP0002, Invitrogen). The proteins were transferred onto

0.2- μ m Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (#162-0176; BioRad) and probed overnight at 6°C with primary antibodies diluted in Tris-buffered saline (pH 7.7) (TBS) + 0.05% Tween 20 (TTBS): anti- σ 1R (#42-3300, Invitrogen), anti-CaM (#05-173, Merck-Millipore), or the anti-HINT1 antibody produced in rabbits against the peptide sequence GYRMVVNEGADGGG (aa 93–106; Immunostep, Spain). All primary antibodies were detected using the appropriate horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies. Thus, the blot areas containing the corresponding sizes of the cloned target proteins were selected for image capture and analysis. The Western blot images were visualized by chemiluminescence (#170-5061; BioRad) and recorded on an ImageQuant™ LAS 500 (GE). For each blot, the area containing the target cloned protein was typically selected. The device automatically captures the selected area and the associated software automatically calculated the optimal exposure time to provide the strongest possible signal from which the rest of the signals could be accurately quantified. For each group of immunosignals derived from the same cloned protein, the area of the strongest signal was used to determine the average optical density of the pixels within the object area/mm² of all the signals (AlphaEase FC software). The gray values of the means were then normalized within the 8 bit/256 gray levels [(256 – computed value)/computed value].

Statistical Analyses

The signals from the Western blot were expressed as the change relative to the controls, which were assigned an arbitrary value of 1. Statistical analyses were performed using the Sigmaplot/SigmaStat v.14 package [statistical package for the social sciences (SPSS) Science Software, Erkrath, Germany], and the level of significance was considered as $p < 0.05$. The data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett multiple comparisons against the control group.

RESULTS

Interactions Between Sigma 1 Receptor, Calmodulin, and Histidine Triad Nucleotide-Binding Protein 1 with the N- and C-terminal Cytosolic Domains of Transient Receptor Potential Ankyrin Member 1/Melastatin Member 8/Vanilloid Member 1

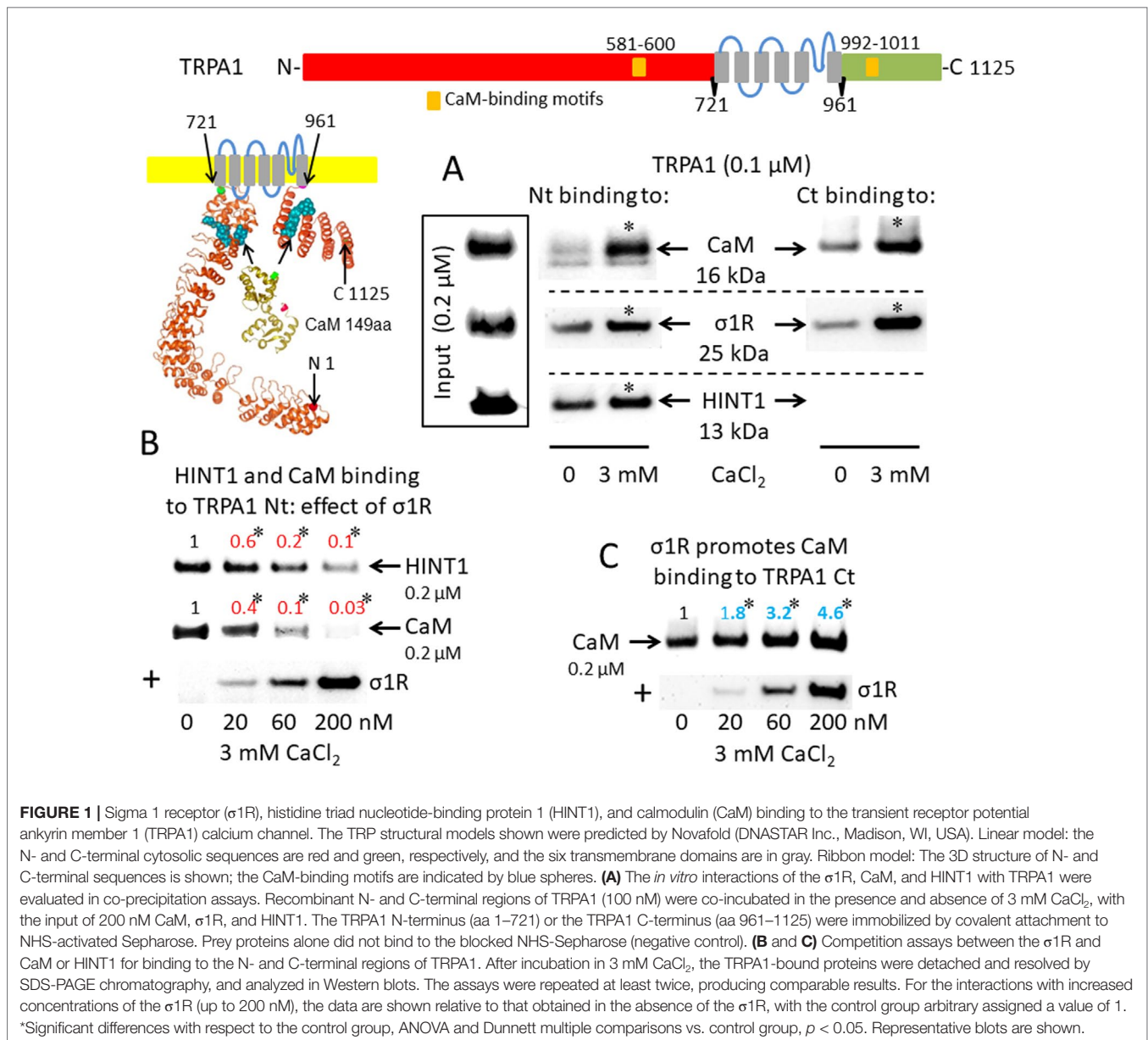
The activation of CaM by calcium provides a mechanism to rapidly regulate different signaling pathways and protein activities, such TRP cationic permeation. Protein analysis (DNASTAR NovaFold v15, Madison, USA) suggests the presence of CaM-binding motifs in the cytosolic sequences of the studied TRPs (Yap et al., 2000), and indeed, we identified a stable calcium-dependent interaction between CaM and the N- and C-terminal regions of TRPA1 (Figure 1A). The σ 1R exhibited binding to both cytosolic regions of the TRPA1 channel, which increased considerably in the presence of 3 mM CaCl₂. In contrast, the HINT1 protein interacted with the N-terminal but not the C-terminal domain of TRPA1. The formation of HINT1-TRPA1 complexes was moderately dependent on the calcium concentration (Figure 1A);

importantly, the binding of the σ 1R to the TRPA1 N-terminal domain prevented the binding of the HINT1 protein (Figure 1B). Although σ 1R and CaM bind to the N- and C-terminal cytosolic regions of TRPA1, σ 1R and CaM only compete for binding to the TRPA1 N-terminal domain (Figure 1B), whereas σ 1R substantially enhanced the binding of CaM to the TRPA1 C-terminus (Figure 1C). Thus, σ 1R competes with CaM and HINT1 for binding to the N-terminal domain of TRPA1.

A putative CaM-binding site was predicted in the TRPM8 N-terminal but not the C-terminal domain, and this binding was confirmed in our *in vitro* assays with the cloned proteins. Indeed, we detected the calcium-dependent binding of CaM, σ 1R, and HINT1 to the N-terminus of TRPM8 (Figure 2A). In the absence of calcium, HINT1 interacted with the channel; the σ 1R and CaM were virtually undetectable. The σ 1R competed with CaM, but not with HINT1, for binding to the N-terminal region of TRPM8 (Figure 2B). Regarding the TRPV1 channel, its N-terminal ankyrin repeat domain and short distal C-terminal segment contained putative CaM-binding motifs. The σ 1R, CaM, and, to a lesser extent, HINT1 all interacted with TRPV1, and their binding increased in the presence of 3 mM CaCl₂ (Figure 3A). Similar to TRPA1, HINT1 bound to the N-terminal domain of TRPV1, but not to its C-terminus, although it did not apparently affect the binding of σ 1R to this N-terminal region of TRPV1 (Figure 3B). However, the binding of σ 1R hindered the interaction between CaM and the TRPV1 N- and C-terminal sequences (Figure 3B and C).

Ligands of Sigma 1 Receptor Modify the Formation of the Sigma 1 Receptor–Transient Receptor Potential Ankyrin Member 1/Melastatin Member 8/Vanilloid Member 1 Complexes

For comparison with other reports, we will refer to the σ 1R ligands as agonists and antagonists, based on their effects on the analgesic assays with morphine in rodents (Mei and Pasternak, 2002). In the presence of 3 mM CaCl₂, the agonist pregnenolone sulfate blocked the interactions of the σ 1R with both the N- and C-terminal domains of TRPA1 (Figure 4). Conversely, the antagonist progesterone enhanced the interaction of the σ 1R with the N-terminal domain of TRPA1, while reducing its binding to the TRPA1 C-terminus. Pregnenolone sulfate also reduced the binding of the σ 1R to the TRPV1 N-terminus, while substantially increasing the association of the σ 1R with TRPV1 C-terminus and TRPM8 N-terminal sequence. Progesterone slightly augmented the interaction of σ 1R with the TRPV1 N-terminal domain, while reducing σ 1R binding to the TRPV1 C-terminus and TRPM8 N-terminus. The effects of neurosteroids on the interactions of σ 1R with the three TRPs were mostly reproduced by exogenous ligands of this receptor. Thus, the selective antagonist S1RA modulated these associations to a similar extent as pregnenolone, and with the exception of TRPV1 N-terminus, the agonist PRE084 also reproduced the effects of pregnenolone sulfate (Figure 4). These data are summarized in Table 1. Conversely, the ligands that promote or did not alter the association of σ 1R with TRP domains reduced the disruptive effects of other ligands on these σ 1R–TRP complexes. For example, the interaction between pregnenolone sulfate and PRE084 at



the TRPV1 N-terminus is of particular interest. Both ligands are considered agonists but pregnenolone sulfate weakened the σ 1R–TRPV1 interaction at the N-terminus more effectively than PRE084. Hence, PRE084 diminished the capacity of pregnenolone sulfate to disrupt this particular σ 1R interaction (Figure 5).

DISCUSSION

This molecular *in vitro* study demonstrates the physical interactions of σ 1R with N- and C-terminal domains of the TRPA1, TRPM8, and TRPV1 calcium channels, and the dependence of its binding on calcium levels. Notably, calcium regulates σ 1R binding to TRPs and also its interactions with the BiP protein in the ER (Hayashi and Su, 2007) and the NR1 C1 subunit of

the NMDAR (Rodríguez-Muñoz et al., 2015a; Rodríguez-Muñoz et al., 2015b). Increases in calcium levels always promote the σ 1R interaction with third partner signaling proteins, while calcium depletion reduces these associations. In the case of σ 1R, a ligand-operated chaperone, depending on the interacting protein, BiP or NR1 C1, the same σ 1R ligand either promotes the disruption of the complex or prevents the disrupting activities of other ligands. In this context, the present study confirmed the disparate activities of σ 1R ligands to regulate the interactions of this chaperone with the cytosolic domains of the TRPA1, TRPM8, and TRPV1 channels. Based on all these observations, calcium emerges as the main known physiological regulator of σ 1R chaperone activity. In this context, the regulation of σ 1R interactions by endogenous molecules, such as steroids, *N,N*-dimethyltryptamine, sphingosine, monoglycosylated ceramide,

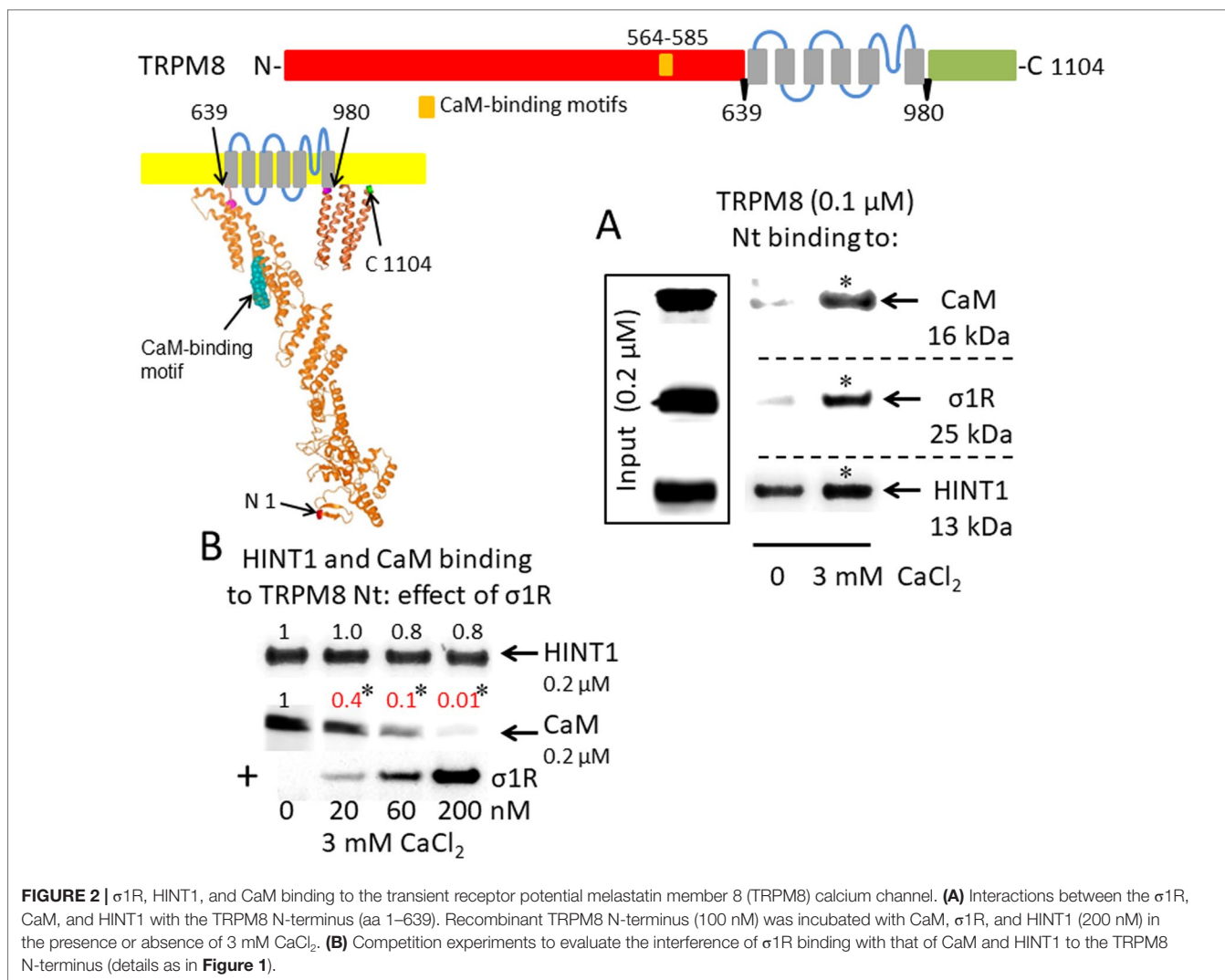


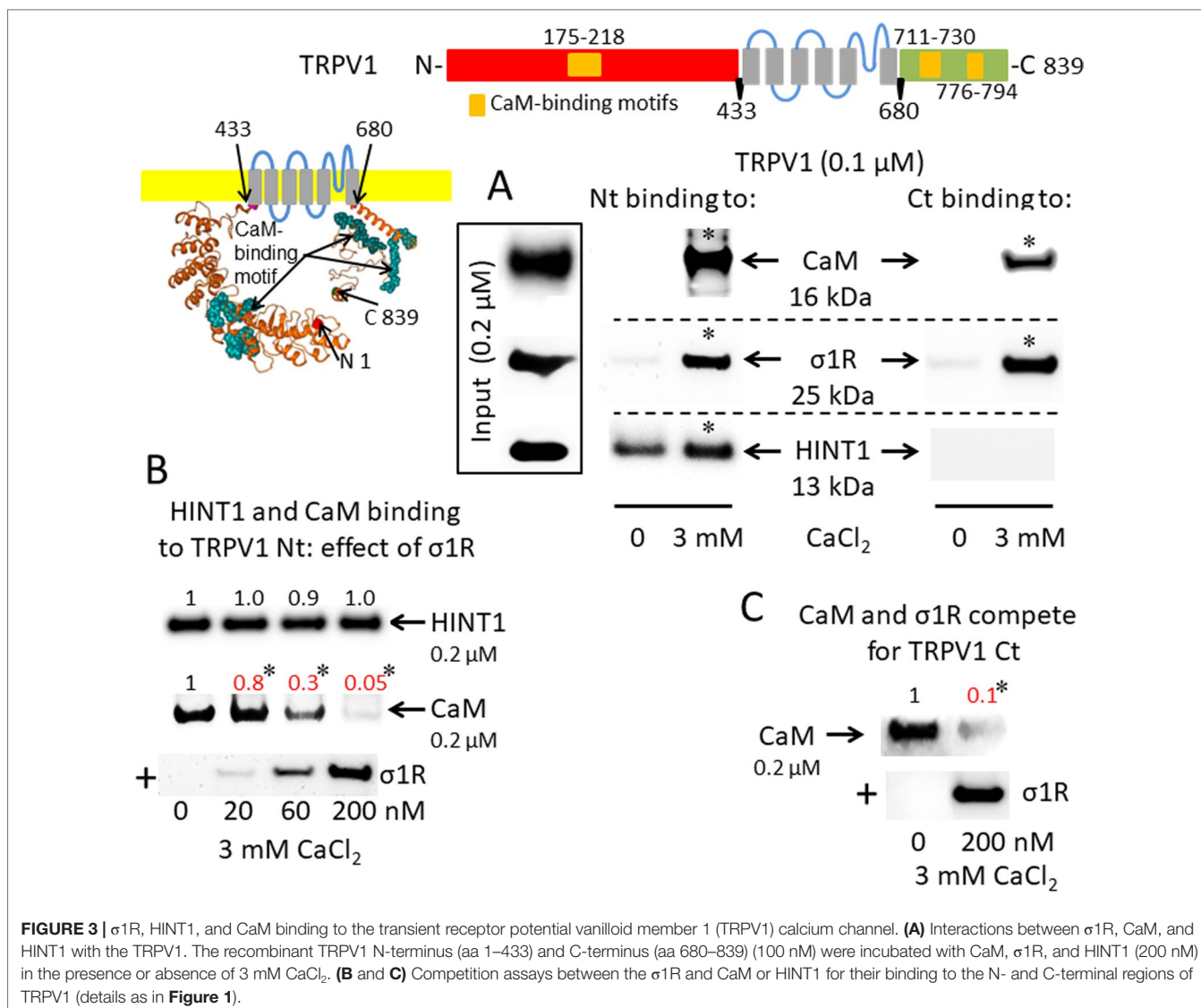
FIGURE 2 | σ 1R, HINT1, and CaM binding to the transient receptor potential melastatin member 8 (TRPM8) calcium channel. **(A)** Interactions between the σ 1R, CaM, and HINT1 with the TRPM8 N-terminus (aa 1–639). Recombinant TRPM8 N-terminus (100 nM) was incubated with CaM, σ 1R, and HINT1 (200 nM) in the presence or absence of 3 mM CaCl_2 . **(B)** Competition experiments to evaluate the interference of σ 1R binding with that of CaM and HINT1 to the TRPM8 N-terminus (details as in **Figure 1**).

etc. (Hayashi, 2015), as well as exogenous compounds has attracted increasing pharmacological interest.

As described for the NMDAR (Ehlers et al., 1996), the calcium-activated CaM also reduces calcium permeation through TRP channels (Numazaki et al., 2003; Rosenbaum et al., 2004; Sarria et al., 2011; Hasan et al., 2017). The computer-predicted CaM-binding cytosolic regions in TRPA1, TRPM8, and TRPV1 coincided with the sites previously reported through mutation and sequence deletion assays (Numazaki et al., 2003; Rosenbaum et al., 2004; Hasan et al., 2017). The CaM binding motifs in NR1 C1 subunits overlap with the binding sites of the σ 1R (Rodríguez-Muñoz et al., 2015b). Our observations also suggest that a similar phenomenon occurs in the TRPV1 N- and C-terminal regions and TRPA1 and TRPM8 N-termini. The TRPA1 C-terminus exhibit noticeable CaM binding, even in the absence of calcium, and this CaM binding motif must be located close to the σ 1R binding site; thus, the chaperone positively influences CaM binding, suggesting a dual regulatory role for CaM in the function of this TRP. Indeed, at low calcium levels, CaM binds to TRPA1 C-terminus and increases calcium permeation through the channel; however, when calcium

concentrations increase over a certain level, CaM, probably by binding to the N-terminus, desensitizes the TRPA1 channel (Hasan et al., 2017). Similar to the σ 1R, ATP/Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) also prevents the desensitizing effect of CaM binding to the TRPV1 channel (Lishko et al., 2007); however, biochemical data addressing the possible competence of their binding to the receptor are unavailable. Regarding the physiological relevance of the present study, the σ 1R always prevented CaM binding to the TRPs at matched concentrations, with the exception of the TRPA1 C-terminus, where σ 1R binding cooperated with CaM binding. Since the σ 1R negatively regulates the inhibitory effect of CaM on NMDAR function (Rodríguez-Muñoz et al., 2015b), a similar mechanism may regulate TRP activity. The binding of the σ 1R to TRPs may favor the open probability of the channel, while CaM will reduce TRP activity by competing and diminishing σ 1R binding. Hence, the resulting activity of the TRP calcium channels may depend on the concentrations of CaM and σ 1R in their cytosolic environment.

The physiological mechanism regulating the NMDAR may be altered by exogenous compounds with antagonist activity at



the σ 1R, which promote CaM binding to the NR1 C1 subunit by disrupting the σ 1R–NR1 C1 association, thereby inhibiting calcium permeation through the NMDAR. With respect to TRPs, the *in vivo* administration of the σ 1R antagonists BD1063 or progesterone to mice promotes TRPV1 downregulation in DRG sensory neurons (Ortiz-Renteria et al., 2018), suggesting a protective effect of the σ 1R chaperone on TRPV1 integrity. This pharmacological intervention may have disturbed the equilibrium between σ 1R and CaM binding to the TRPV1, thus promoting an anomalous CaM-mediated inhibition of TRP function and the removal of the calcium channel from the neural membrane. The present molecular study showed how CaM, σ 1R and HINT1 bind to cytosolic regions of the selected TRPs; however, the structural organization of the TRP channels raises a series of questions about the manner in which calcium-activated CaM regulates their function. TRPs are homotetramers and, in general, their N- and C-terminal domains contain CaM binding-motifs. Therefore, further studies are needed to elucidate whether

CaM binding to just one site suffices to inhibit the channel or whether the extent of inhibition depends on the number of sites to which CaM binds in the channel, as suggested in a previous study (Rosenbaum et al., 2004). Another relevant issue is whether CaM binding to N-terminal regions collaborates with CaM binding to C-terminal regions, or if it accomplishes a different purpose. Further functional studies are required to address these questions.

The HINT1 and σ 1R proteins are widely distributed in different tissues and are present in most cellular compartments (Hayashi and Su, 2007; Liu et al., 2008). At the neural membrane, HINT1 forms complexes with the cytosolic domains of different GPCRs, including MOR and cannabinoid type 1 (Guang et al., 2004; Sánchez-Blázquez et al., 2014). The σ 1R also interacts with GPCRs and is implicated in the regulation of MOR activity (Sánchez-Blázquez et al., 2012; Rodríguez-Muñoz et al., 2015a). The MOR-associated HINT1 protein binds to the N-terminal domains of the TRPs evaluated in the present study, and this binding moderately increased in the presence of calcium. While

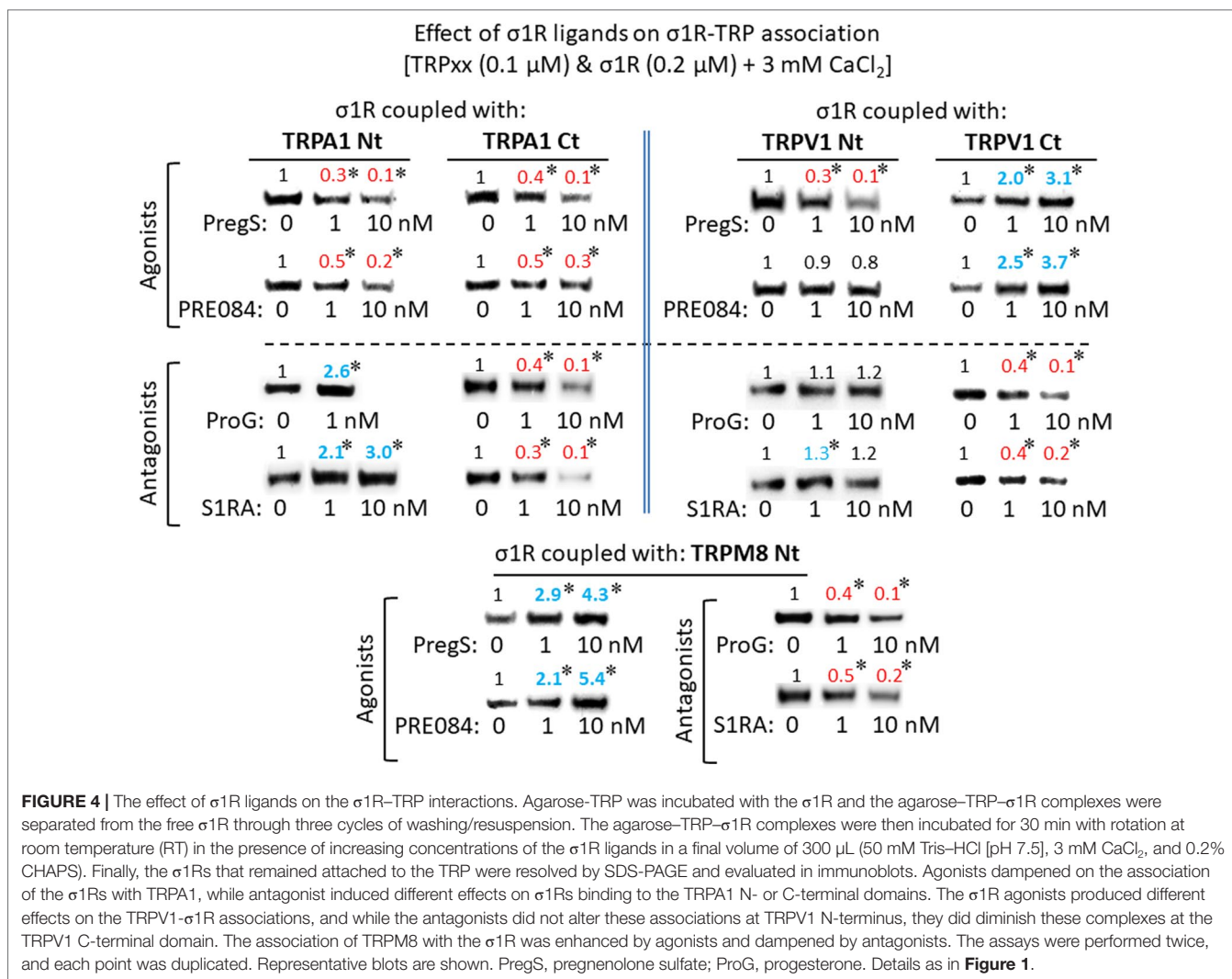


TABLE 1 | Effect of sigma 1 receptor (σ 1R) ligands on the association of σ 1Rs with different signaling proteins.

Ligands	TRPA1 Nt	TRPA1 Ct	TRPV1 Nt	TRPV1 Ct	TRPM8 Nt	NR1 C0-C1	BiP
PregS	↓	↓	↓	↑	↑	↑ (a)	↓ (b)
PRE084	↓	↓	= *	↑	↑	↑ (a)	↓ (b)
ProG	↑	↓	=	↓	↓	↓ (a)	↑ (b)
S1RA	↑	↓	↑	↓	↓	↓ (a)	-

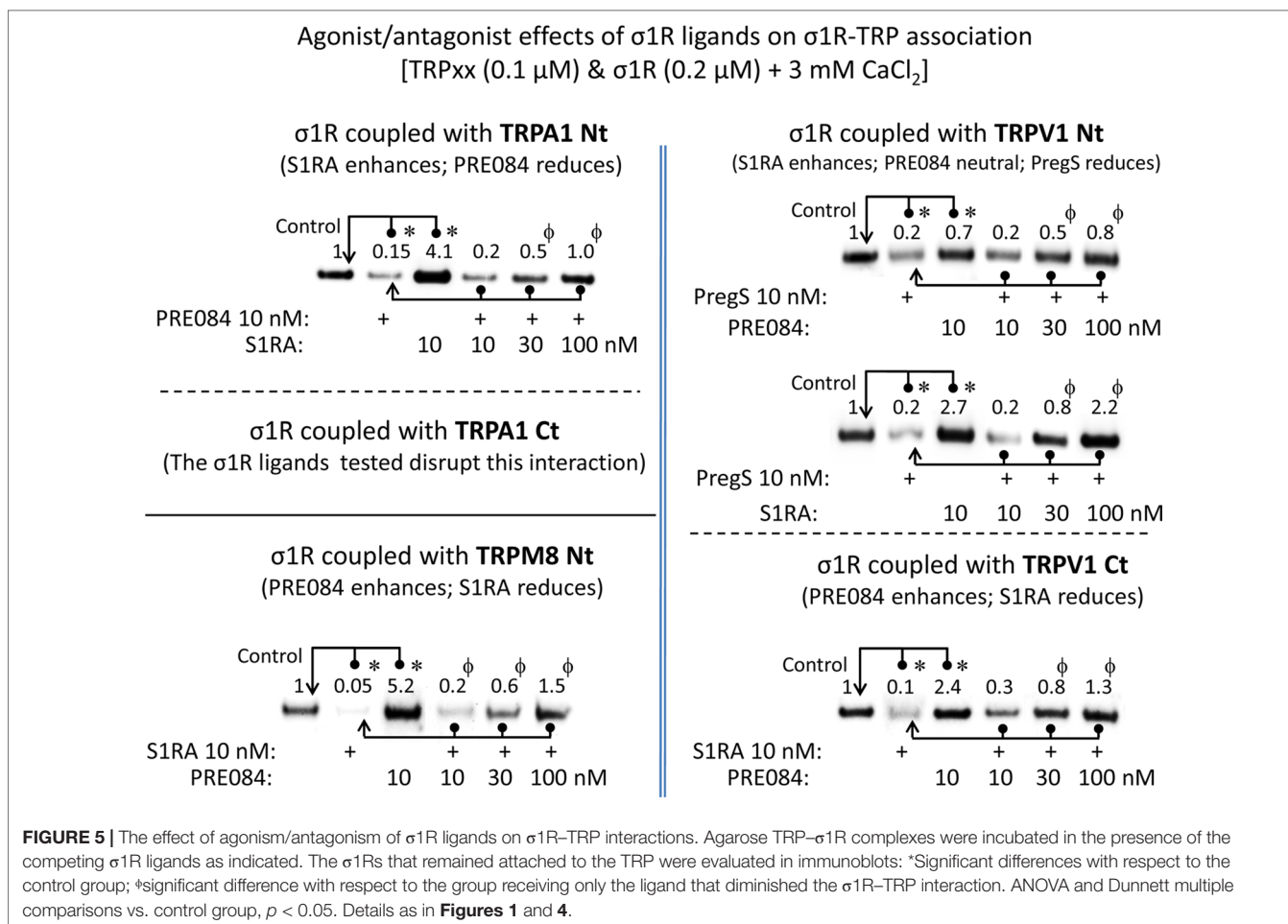
The arrows ↑ and ↓ indicate the enhancement or reduction in σ 1R-target protein associations, while = denotes no change in such associations, *even though the ligand does not alter the σ 1R-TRP interaction, the disruptive effect of pregnenolone sulfate (PregS) was impaired. References reporting the effects of σ 1R ligands on the σ 1R-NR1 or σ 1R-binding immunoglobulin protein (BiP) interactions: (a) Rodríguez-Muñoz et al., 2015b, *Antioxid. Redox Signal.* 22: 799–818; (b) Hayashi and Su, 2007, *Cell* 131: 596–610.

PregS, pregnenolone sulfate; ProG, progesterone; BiP, binding immunoglobulin protein.

the HINT1-NMDAR interaction is disrupted by σ 1R binding, the HINT1-TRPM8/V1 N-terminal interactions were not affected by σ 1R, which only impaired HINT1 binding to the TRPA1 N-terminal domain. These observations are compatible

with MOR signaling, and probably that of other GPCRs, to influence TRP activity. Because HINT1 proteins interact with signaling proteins in zinc and redox-dependent and independent manners (Ajit et al., 2007; Rodríguez-Muñoz and Garzón, 2013), HINT1-TRP interactions may connect these channels to different signaling pathways in the membrane. These interactions may also influence events in the nucleus, where HINT1 exerts its anti-tumor activity and interacts with transcription factors (Weiske and Huber, 2005; Scholer et al., 2015).

The issue of ligand activity in modulating the binding of σ 1Rs to different proteins is of particular pharmacological interest. In systems other than the regulation of MOR-mediated analgesia, σ 1R pharmacology is complex, with exogenous ligands producing different effects depending on the system under study (Maurice and Su, 2009). Indeed, researchers have not clearly determined whether ligands are agonists or antagonists when they promote certain σ 1R-mediated effects, such as neuroprotection or anti-convulsing effects (Rodríguez-Muñoz et al., 2018; Sánchez-Blázquez et al., 2018). Thus, the modulatory effects of σ 1R ligands on the interactions of this chaperone are dissimilar and, for new σ 1R interactors, unpredictable. As aforementioned,



this characteristic was initially observed for σ 1R interactions with BiP and NR1 C1 subunits of the NMDAR, where the effects of the ligands tested were completely opposite. The agonists disrupt σ 1R-BiP complexes and antagonists prevent the effect of agonists, but the antagonists disrupt σ 1R-NR1 C1 complexes and agonists oppose the effects of the former ligands. The associations of σ 1Rs with cytosolic regions of TRPA1, TRPM8, and TRPV1 did not escape this complex regulation by σ 1R ligands, and thus the effects of agonists and antagonists on these complexes did not show a common pattern but rather varied, depending on the channel and even the cytosolic region considered. The data from the literature and the present study suggest the existence of at least three main types of interactions of the σ 1R with other proteins. The first type accounts for the negative regulation of MOR analgesia by σ 1Rs, in which the neural glutamate NMDAR plays an essential role (Garzón et al., 2012; Rodríguez-Muñoz et al., 2015b). Antagonists disrupt and agonists promote σ 1R binding to the TRPM8 N-terminus and TRPV1 C-terminus, where σ 1R and CaM compete for binding to the TRP channel. The second classification involves the TRPA1 N-terminal region and probably the TRPV1 N-terminus, and it corresponds to the interaction of the σ 1R with BiP in the ER (Hayashi and Su, 2007). In this situation, agonists disrupt σ 1R binding and antagonists promote or fail to modify it, although they block the effects of

agonists. Again, the σ 1R and CaM compete for binding to the TRP channel. In the third category, agonists and antagonists disrupt σ 1R binding to the TRPA1 C-terminal domain.

Overall, the effects of different ligands on the interactions of this chaperone with its targets are similar to those described for the agonists of most GPCRs, which is actually known as agonist bias. This phenomenon is typical of exogenous ligands, although some reports have described this signaling pathway preference for GPCRs with various endogenous ligands, e.g., the endogenous opioids and the MOR (Thompson et al., 2015). The cytosolic regions of a given 7-TM GPCR bind to different G proteins and certain ligands exhibit a preference to activate the receptor when it is coupled to some but not all the regulated G proteins. We have characterized this situation for clonidine and agonists of the MOR and delta-opioid receptors (Sánchez-Blázquez et al., 1999; Sánchez-Blázquez et al., 2001); the affinity exhibited by opioid agonists, but not antagonists, depends on the class of G protein coupled to the MOR (Garzón et al., 1998). More relevantly, those opioid agonists exhibiting biased activity through discrete combinations of MOR with G proteins bind to the other combinations, but without triggering the signaling pathways. Thus, agonist-biased MOR opioids also display antagonism toward the effects of other biased or unbiased agonists while acting on MOR-G protein combinations on which

the former are inactive (Sánchez-Blázquez and Garzón, 1988; Garzón et al., 1994). Thus, the GPCR field and concrete studies of the MOR have shown that ligands may behave as biased agonists and even antagonists, depending in the class of G protein coupled to the opioid receptor.

The situation described for GPCR and G proteins compares satisfactorily with the findings being documented for the σ 1R in its interactions with signaling proteins. The G proteins that interact with the GPCR determine the agonist/antagonist activity of the ligands, and the different signaling proteins that associate with the σ 1R determine the activity of a given ligand, namely, dissociation or stabilization. Thus, the σ 1R would compare with a GPCR, as the interacting proteins, BiP, NR1 C1, and TRP cytosolic domains, play similar roles to the different classes of G proteins, Gi, Go, Gz, Gq, etc. As observed for the interactions of the MOR with different G proteins (Garzón et al., 1998), the conformation adopted by σ 1R when it binds to the NR1 C1 and BiP must differ, and the conformation when binding to the TRPA1 C-terminus may also be different. The association of the σ 1R with the TRPV1 N-terminus was diminished by pregnenolone sulfate but only mildly by PRE084. In this situation, the latter ligand binds to the σ 1R and diminishes the effects of the neurosteroid. Antagonism was also detected, and the σ 1R ligands that did not influence σ 1R–TRP interactions diminished the effects of the active ligands. Thus, one should not expect any particular σ 1R ligand to exert a similar effect on all TRP channels, as its activity is likely to depend on the channel type and even on the particular cytosolic region analyzed.

TRP channels have been implicated in a wide range of physiological activities. In peripheral nerves, ganglia, and the substantia gelatinosa of the dorsal horn, the activation of TRP channels by different agents contributes to pain perception and even allodynia. The expression of certain TRPs in supraspinal areas, such as those included in this study, suggest that they may participate in other signaling processes that are yet to be defined. The precise role of HINT1 in modulating TRPM8 and TRPV1 channels remains to

be explored, although the proposed connections between TRPV1 and MOR (Ortiz-Renteria et al., 2018) suggest that the σ 1R–HINT1 protein complex functions to connect calcium channels such as the TRPs and NMDAR with this GPCR. Thus, σ 1R ligands exhibit biased activity to regulate subsets of σ 1R interactions with third partner proteins, and this finding may be exploited in the development of site-specific drugs with therapeutic significance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JG and PS-B designed the research, wrote the manuscript, and obtained the funding. EC-M and YO performed the experiments and the statistical analysis of data. MM helped to perform the analysis with constructive discussions. All authors approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by MICINN Plan Nacional I+D+i [grant number RT 2018-093677-B-100]. EC-M was supported by a Grant from MECD [FPU 15/02356].

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Gabriela de Alba, Veronica Merino, and Maria Jose López for their excellent technical assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00634/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Ajit, S. K., Ramineni, S., Edris, W., Hunt, R. A., Hum, W. T., Hepler, J. R., et al. (2007). RGSZ1 interacts with protein kinase C interacting protein PKC ϵ -1 and modulates mu opioid receptor signaling. *Cell. Signal.* 19, 723–730. doi: 10.1016/j.cellsig.2006.09.008
- Camprubi-Robles, M., Planells-Cases, R., and Ferrer-Montiel, A. (2009). Differential contribution of SNARE-dependent exocytosis to inflammatory potentiation of TRPV1 in nociceptors. *FASEB J.* 23, 3722–3733. doi: 10.1096/fj.09-134346
- Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K. R., et al. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306–313. doi: 10.1126/science.288.5464.306
- Cobos, E. J., Entrena, J. M., Nieto, F. R., Cendan, C. M., and Del, P. E. (2008). Pharmacology and therapeutic potential of sigma(1) receptor ligands. *Curr. Neuropharmacol.* 6, 344–366. doi: 10.2174/157015908787386113
- Davis, J. B., Gray, J., Gunthorpe, M. J., Hatcher, J. P., Davey, P. T., Overend, P., et al. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405, 183–187. doi: 10.1038/35012076
- Diaz, J. L., Zamanillo, D., Corbera, J., Baeyens, J. M., Maldonado, R., Pericas, M. A., et al. (2009). Selective sigma-1 (sigma1) receptor antagonists: emerging target for the treatment of neuropathic pain. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 9, 172–183. doi: 10.2174/1871524910909030172
- Ehlers, M. D., Zhang, S., Bernhardt, J. P., and Haganir, R. L. (1996). Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* 84, 745–755. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81052-1
- Fajardo, O., Meseguer, V., Belmonte, C., and Viana, F. (2008). TRPA1 channels mediate cold temperature sensing in mammalian vagal sensory neurons: pharmacological and genetic evidence. *J. Neurosci.* 28, 7863–7875. doi: 10.1523/jneurosci.1696-08.2008
- Garzón, J., Castro, M., and Sánchez-Blázquez, P. (1998). Influence of Gz and Gi2 transducer proteins in the affinity of opioid agonists to mu receptors. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2557–2564. doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.t01-1-00267.x
- Garzón, J., Martínez-Peña, Y., and Sánchez-Blázquez, P. (1994). Dissimilar efficacy of opioids to produce mu-mediated analgesia: role of Gx/z and Gi2 transducer proteins. *Life Sci.* 55, L205–L212. doi: 10.1016/0024-3205(94)90048-5
- Garzón, J., Rodríguez-Muñoz, M., and Sánchez-Blázquez, P. (2012). Direct association of Mu-opioid and NMDA glutamate receptors supports their cross-regulation: molecular implications for opioid tolerance. *Curr. Drug Abuse Rev.* 5, 199–226. doi: 10.2174/1874473711205030199
- Guang, W., Wang, H., Su, T., Weinstein, I. B., and Wang, J. B. (2004). Role of mPKC ϵ , a novel mu-opioid receptor interactive protein, in receptor desensitization, phosphorylation, and morphine-induced analgesia. *Mol. Pharmacol.* 66, 1285–1292. doi: 10.1124/mol.66.5
- Hasan, R., Leeson-Payne, A. T., Jaggari, J. H., and Zhang, X. (2017). Calmodulin is responsible for Ca(2+)-dependent regulation of TRPA1 Channels. *Sci. Rep.* 7, 45098–. doi: 10.1038/srep45098

- Hayashi, T. (2015). Sigma-1 receptor: the novel intracellular target of neuropsychotropic drugs. *J. Pharmacol. Sci.* 127, 2–5. doi: 10.1016/j.jpsh.2014.07.001
- Hayashi, T., and Su, T. P. (2007). Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell* 131, 596–610. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.036
- Huang, J., Zhang, X., and McNaughton, P. A. (2006). Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr. Neuropharmacol.* 4, 197–206. doi: 10.2174/157015906778019554
- Hudson, L. J., Bevan, S., Wotherspoon, G., Gentry, C., Fox, A., and Winter, J. (2001). VRI protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *Eur. J. Neurosci.* 13, 2105–2114. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01591.x
- Jordt, S. E., Bautista, D. M., Chuang, H. H., McKemy, D. D., Zygmunt, P. M., Hogestatt, E. D., et al. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427, 260–265. doi: 10.1038/nature02282
- Julius, D. (2013). TRP channels and pain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 355–384. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155833
- Kaneko, Y., and Szallasi, A. (2014). Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2474–2507. doi: 10.1111/bph.12414
- Katsura, H., Obata, K., Mizushima, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., et al. (2006). Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. *Exp. Neurol.* 200, 112–123. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.01.031
- Kim, H. W., Kwon, Y. B., Roh, D. H., Yoon, S. Y., Han, H. J., Kim, K. W., et al. (2006). Intrathecal treatment with sigma1 receptor antagonists reduces formalin-induced phosphorylation of NMDA receptor subunit 1 and the second phase of formalin test in mice. *Br. J. Pharmacol.* 148, 490–498. doi: 10.1038/sj.bjp.0706764
- Kitaichi, K., Chabot, J. G., Moebius, F. F., Flandorfer, A., Glossmann, H., and Quirion, R. (2000). Expression of the purported sigma(1) [sigma(1)] receptor in the mammalian brain and its possible relevance in deficits induced by antagonism of the NMDA receptor complex as revealed using an antisense strategy. *J. Chem. Neuroanat.* 20, 375–387. doi: 10.1016/S0891-0618(00)00106-X
- Lishko, P. V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C. B., and Gaudet, R. (2007). The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* 54, 905–918. doi: 10.1016/j.neuron.2007.05.027
- Liu, Q., Puche, A. C., and Wang, J. B. (2008). Distribution and expression of protein kinase C interactive protein (PKCI/HINT1) in mouse central nervous system (CNS). *Neurochem. Res.* 33, 1263–1276. doi: 10.1007/s11064-007-9578-4
- Martin, W. R., Eades, C. G., Thompson, J. A., Huppler, R. E., and Gilbert, P. E. (1976). The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197, 517–532.
- Maurice, T., and Su, T. P. (2009). The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol. Ther.* 124, 195–206. doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.07.001
- Mei, J., and Pasternak, G. W. (2002). Sigma1 receptor modulation of opioid analgesia in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 1070–1074. doi: 10.1124/jpet.300.3.1070
- Mickle, A. D., Shepherd, A. J., and Mohapatra, D. P. (2015). Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 131, 73–118. doi: 10.1016/bs.pmbts.2015.01.002
- Numazaki, M., Tominaga, T., Takeuchi, K., Murayama, N., Toyooka, H., and Tominaga, M. (2003). Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8002–8006. doi: 10.1073/pnas.1337252100
- Obata, K., Katsura, H., Mizushima, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., et al. (2005). TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J. Clin. Invest.* 115, 2393–2401. doi: 10.1172/JCI25437
- Ortiz-Renteria, M., Juarez-Contreras, R., Gonzalez-Ramirez, R., Islas, L. D., Sierra-Ramirez, F., Llorente, I., et al. (2018). TRPV1 channels and the progesterone receptor Sig-1R interact to regulate pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E1657–E1666. doi: 10.1073/pnas.1715972115
- Owsianik, G., D'hoedt, D., Voets, T., and Nilius, B. (2006). Structure-function relationship of the TRP channel superfamily, in *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 156. Ed. S. Amara (Berlin, Heidelberg: Springer), 61–90. doi: 10.1007/s10254-005-0006-0
- Patapoutian, A., Tate, S., and Woolf, C. J. (2009). Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 55–68. doi: 10.1038/nrd2757
- Rodríguez-Muñoz, M., and Garzón, J. (2013). Nitric oxide and zinc-mediated protein assemblies involved in mu opioid receptor signaling. *Mol. Neurobiol.* 48, 769–782. doi: 10.1007/s12035-013-8465-z
- Rodríguez-Muñoz, M., Cortés-Montero, E., Pozo-Rodríguez, A., Sánchez-Blázquez, P., and Garzón-Niño, J. (2015a). The ON:OFF switch, sigma1R-HINT1 protein, controls GPCR-NMDA receptor cross-regulation: implications in neurological disorders. *Oncotarget* 6, 35458–35477. doi: 10.18632/oncotarget.6064
- Rodríguez-Muñoz, M., Sánchez-Blázquez, P., Herrero-Labrador, R., Martínez-Murillo, R., Merlos, M., Vela, J. M., et al. (2015b). The sigma1 receptor engages the redox-regulated HINT1 protein to bring opioid analgesia under NMDA receptor negative control. *Antioxid. Redox Signal.* 22, 799–818. doi: 10.1089/ars.2014.5993
- Rodríguez-Muñoz, M., Sánchez-Blázquez, P., and Garzón, J. (2018). Fenfluramine diminishes NMDA receptor-mediated seizures via its mixed activity at serotonin 5HT2A and type 1 sigma receptors. *Oncotarget* 9, 23373–23389. doi: 10.18632/oncotarget.25169
- Roh, D. H., Kim, H. W., Yoon, S. Y., Seo, H. S., Kwon, Y. B., Kim, K. W., et al. (2008). Intrathecal injection of the sigma(1) receptor antagonist BD1047 blocks both mechanical allodynia and increases in spinal NR1 expression during the induction phase of rodent neuropathic pain. *Anesthesiology* 109, 879–889. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181895a83
- Romero, L., Zamanillo, D., Nadal, X., Sánchez-Arroyos, R., Rivera-Arconada, I., Dordal, A., et al. (2012). Pharmacological properties of S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization. *Br. J. Pharmacol.* 166, 2289–2306. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01942.x
- Rosenbaum, T., Gordon-Shaag, A., Munari, M., and Gordon, S. E. (2004). Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J. Gen. Physiol.* 123, 53–62. doi: 10.1085/jgp.200308906
- Sánchez-Blázquez, P., and Garzón, J. (1988). Pertussis toxin differentially reduces the efficacy of opioids to produce supraspinal analgesia in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 152, 357–361. doi: 10.1016/0014-2999(88)90732-7
- Sánchez-Blázquez, P., Gómez-Serranillos, P., and Garzón, J. (2001). Agonists determine the pattern of G-protein activation in mu-opioid receptor-mediated supraspinal analgesia. *Brain Res. Bull.* 54, 229–235. doi: 10.1016/S0361-9230(00)00448-2
- Sánchez-Blázquez, P., Pozo-Rodríguez, A., Merlos, M., and Garzón, J. (2018). The Sigma-1 receptor antagonist, S1RA, reduces stroke damage, ameliorates post-stroke neurological deficits and suppresses the overexpression of MMP-9. *Mol. Neurobiol.* 55, 4940–4951. doi: 10.1007/s12035-017-0697-x
- Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Díaz, M., DeAntonio, I., and Garzón, J. (1999). Endomorphin-1 and endomorphin-2 show differences in their activation of mu opioid receptor-regulated G proteins in supraspinal antinociception in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291, 12–18.
- Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M., Bailón, C., and Garzón, J. (2012). GPCRs promote the release of zinc ions mediated by nNOS/NO and the redox transducer RGSZ2 protein. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 1163–1177. doi: 10.1089/ars.2012.4517
- Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M., Herrero-Labrador, R., Burgueno, J., Zamanillo, D., and Garzón, J. (2014). The calcium-sensitive Sigma-1 receptor prevents cannabinoids from provoking glutamate NMDA receptor hypofunction: implications in antinociception and psychotic diseases. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 1943–1955. doi: 10.1017/S1461145714000029
- Sánchez-Fernández, C., Montilla-García, A., Gonzalez-Cano, R., Nieto, F. R., Romero, L., Artacho-Cordón, A., et al. (2014). Modulation of peripheral mu-opioid analgesia by sigma1 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 348, 32–45. doi: 10.1124/jpet.113.208272
- Sarria, I., Ling, J., Zhu, M. X., and Gu, J. G. (2011). TRPM8 acute desensitization is mediated by calmodulin and requires PIP(2): distinction from tachyphylaxis. *J. Neurophysiol.* 106, 3056–3066. doi: 10.1152/jn.00544.2011
- Scherer, P. C., Zaccor, N. W., Neumann, N. M., Vasavda, C., Barrow, R., Ewald, A. J., et al. (2017). TRPV1 is a physiological regulator of mu-opioid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 13561–13566. doi: 10.1073/pnas.1717005114
- Scholer, J., Ferralli, J., Thiry, S., and Chiquet-Ehrismann, R. (2015). The intracellular domain of teneurin-1 induces the activity of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) by binding to transcriptional repressor HINT1. *J. Biol. Chem.* 290, 8154–8165. doi: 10.1074/jbc.M114.615922

- Su, T. P., Hayashi, T., Maurice, T., Buch, S., and Ruoho, A. E. (2010). The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 557–566. doi: 10.1016/j.tips.2010.08.007
- Su, T. P., London, E. D., and Jaffe, J. H. (1988). Steroid binding at sigma receptors suggests a link between endocrine, nervous, and immune systems. *Science* 240, 219–221. doi: 10.1126/science.2832949
- Thompson, G. L., Lane, J. R., Coudrat, T., Sexton, P. M., Christopoulos, A., and Canals, M. (2015). Biased agonism of endogenous opioid peptides at the mu-opioid receptor. *Mol. Pharmacol.* 88, 335–346. doi: 10.1124/mol.115.098848
- Weiske, J., and Huber, O. (2005). The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF-beta-catenin-mediated transcription. *J. Cell Sci.* 118, 3117–3129. doi: 10.1242/jcs.02437
- Xing, H., Chen, M., Ling, J., Tan, W., and Gu, J. G. (2007). TRPM8 mechanism of cold allodynia after chronic nerve injury. *J. Neurosci.* 27, 13680–13690. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2203-07.2007
- Yap, K. L., Kim, J., Truong, K., Sherman, M., Yuan, T., and Ikura, M. (2000). Calmodulin target database. *J. Struct. Funct. Genomics* 1, 8–14. doi: 10.1023/A:1011320027914

Conflict of Interest Statement: MM is employed by Company Esteve Pharmaceuticals.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Cortés-Montero, Sánchez-Blázquez, Onetti, Merlos and Garzón. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Article

Calmodulin Supports TRPA1 Channel Association with Opioid Receptors and Glutamate NMDA Receptors in the Nervous Tissue

Elsa Cortés-Montero ¹, María Rodríguez-Muñoz ¹, M. Carmen Ruiz-Cantero ², Enrique J. Cobos ², Pilar Sánchez-Blázquez ¹ and Javier Garzón-Niño ^{1,*}

¹ Department of Translational Neurosciences, Neuropharmacology, Cajal Institute, CSIC, Avenida Doctor Arce, 37. 28802 Madrid, Spain; elsa.cortes@cajal.csic.es (E.C.-M.); mrodriguez@cajal.csic.es (M.R.-M.); psb@cajal.csic.es (P.S.-B.)

² Department of Pharmacology and Neurosciences Institute (Biomedical Research Center), University of Granada and Biosanitary Research Institute, ibs. Granada, 18016 Granada, Spain; rcmari@ugr.es (M.C.R.-C.); ejcobos@ugr.es (E.J.C.)

* Correspondence: jgarzon@cajal.csic.es; Tel.: +34-915-854-733; Fax: +34-915-854-754

Abstract: Transient receptor potential ankyrin member 1 (TRPA1) belongs to the family of thermo TRP cation channels that detect harmful temperatures, acids and numerous chemical pollutants. TRPA1 is expressed in nervous tissue, where it participates in the genesis of nociceptive signals in response to noxious stimuli and mediates mechanical hyperalgesia and allodynia associated with different neuropathies. The glutamate N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR), which plays a relevant role in allodynia to mechanical stimuli, is connected via histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) and type 1 sigma receptor (σ 1R) to mu-opioid receptors (MORs), which mediate the most potent pain relief. Notably, neuropathic pain causes a reduction in MOR antinociceptive efficacy, which can be reversed by blocking spinal NMDARs and TRPA1 channels. Thus, we studied whether TRPA1 channels form complexes with MORs and NMDARs that may be implicated in the aforementioned nociceptive signals. Our data suggest that TRPA1 channels functionally associate with MORs, delta opioid receptors and NMDARs in the dorsal root ganglia, the spinal cord and brain areas. These associations were altered in response to pharmacological interventions and the induction of inflammatory and also neuropathic pain. The MOR-TRPA1 and NMDAR-TRPA1 associations do not require HINT1 or σ 1R but appear to be mediated by calcium-activated calmodulin. Thus, TRPA1 channels may associate with NMDARs to promote ascending acute and chronic pain signals and to control MOR antinociception.

Keywords: transient receptor potential A1; mu opioid receptor; calmodulin; glutamate NMDA receptor; neuropathic pain; inflammatory pain



Citation: Cortés-Montero, E.; Rodríguez-Muñoz, M.; Ruiz-Cantero, M.C.; Cobos, E.J.; Sánchez-Blázquez, P.; Garzón-Niño, J. Calmodulin Supports TRPA1 Channel Association with Opioid Receptors and Glutamate NMDA Receptors in the Nervous Tissue. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 229. <https://doi.org/10.3390/ijms22010229>

Received: 9 December 2020

Accepted: 24 December 2020

Published: 28 December 2020

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

TRPA1 is the only mammalian member of the transient receptor potential (TRP) ankyrin channel subfamily [1,2]. Four identical subunits assemble to form the functional TRPA1 nonselective cation channel permeable to Ca^{2+} , Na^+ and K^+ [3]. The monomer contains six membrane-spanning domains and a presumed pore-forming region between the fifth and sixth transmembrane domains. The long N-terminal segment, which contains at least 16 ankyrin repeat domains as the shorter C-terminal region are predicted to be in the cytoplasm [4,5]. TRPA1 was initially suggested to function as a thermodetector of noxious cold stimuli [6]. Although this hypothesis remains controversial [7], there is widespread agreement that TRPA1 plays an important role in chemosensation. TRPA1 detects exogenous irritant compounds (e.g., formalin, acrolein, tear gas, chlorine, isothiocyanates and thiosulfates from mustard, cinnamon, wasabi and garlic) and endogenous compounds (e.g., reactive oxygen species, bradykinin and 4-hydroxynonenal) produced

during tissue damage or neurogenic inflammation [8–11]. Additionally, TRPA1 is activated by non-electrophilic molecules such as menthol and cannabinoids [12,13].

Painful peripheral stimuli are initially detected by primary afferent sensory nerve fibers (C and A δ fibers) that have their soma in the trigeminal ganglia and the dorsal root ganglia (DRG). These peripheral neurons transmit this information to neurons within the spinal cord and thence to the brain via ascending neural circuits [8]. One of the most important sensory transducers that detects and transmits noxious stimuli is the transient receptor potential (TRP) ion channel family [11]. TRPA1 is expressed by nociceptive neurons of DRG and trigeminal ganglia, as well as in cutaneous primary afferent terminals [14]. *Trpa1* mRNA has been localized to small- and medium-diameter sensory neurons, many of which are C- and A δ -fiber nociceptors [12,15,16]. In the spinal dorsal horn, TRPA1 ion channels on the central terminals of peptidergic primary afferent nerve fibers regulate transmission to glutamatergic and GABAergic interneurons [17,18]. TRPA1 has been presented as a candidate to mediate inflammatory mechanical hyperalgesia as well as cold hyperalgesia under inflammatory conditions; indeed HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity [19,20]. TRPA1 channels are also involved in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation [20]. Furthermore, formalin excites sensory neurons by directly activating TRPA1. In fact, blockade of TRPA1 in vivo, either using a specific antagonist or through disruption of the TRPA1 gene substantially attenuates pain-related responses to formalin [21]. Thus, based on its localization and functional properties, TRPA1 is considered a key player in acute and chronic (neuropathic) pain [22–25].

On the other hand, a series of neural changes associated with neuropathic pain originate from anomalous persistent activation of N-methyl-D-aspartate glutamatergic receptors (NMDARs), which triggers a cascade of events leading to central nervous system hypersensitization (“central windup”) [26,27]. In fact, neuropathic pain characterized by tactile allodynia and hyperalgesia remits after blockade of NMDAR function [28]. NMDARs in the spinal dorsal horn play a key role in chronic pain and central sensitization [29] and their interaction with opioid receptors plays an important role in regulating nociceptive transmission between primary afferents and dorsal horn neurons. NMDARs are present in primary afferents [30,31] and evoke the release of substance P from their central terminals [32]. Conversely, substance P release from primary afferents is inhibited by mu-opioid receptors (MORs) [33,34] and delta-opioid receptors (DORs) [35]. In the latent sensitization model of chronic pain, spinal cord hyperalgesia is maintained by NMDARs [36] and suppressed by MORs, DORs and kappa-opioid receptors [37]. In nervous tissue, NMDARs play an essential role in MOR desensitization [38,39] and neuropathic pain leads to reduced morphine efficacy and more rapid development of tolerance [40,41]. Interestingly, antinociceptive morphine tolerance is attenuated by blocking spinal TRPA1. This suggests that spinal TRPA1 may also contribute, at least in part, to the facilitation of morphine antinociceptive tolerance [42].

MOR, via histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) and type 1 sigma receptor (σ 1R), connects with the NR1 subunit of NMDARs [43,44] and positively regulates NMDAR calcium (Ca^{2+}) fluxes [45]. σ 1R binds to the NMDAR NR1 subunit in a Ca^{2+} -dependent manner [44,46] and thus prevents the binding of the NMDAR negative regulator calmodulin (CaM) [47–49]. Notably, the HINT1 protein and CaM bind to the N- and C-terminal domains of various TRPs, including TRPA1. σ 1R competes with CaM for binding to TRPs, except for its binding to the TRPA1 C-terminus, where σ 1R promotes binding of CaM [50].

The aforementioned evidence prompted us to investigate whether TRPA1 channels associate with MORs, DORs and NMDARs. The study was performed principally on DRG, spinal cord and cortex and the possibility of direct associations was explored in in vitro assays with cloned sequences of these proteins. Ex vivo studies indicated the association of TRPA1 with MORs, DORs and NMDARs in vivo and these associations were altered by pharmacological interventions, the administration of a chemical irritant such as formalin

and during neuropathic pain. The *in vitro* assays suggest a role for CaM in the association of TRPA1 with MORs and the NR1 regulatory subunit of NMDARs.

2. Results

2.1. TRPA1 Channel Association with MORs, DORs and NR1 Subunits, in the Cerebral Cortex, Spinal Cord and DRGs. Effect of Pharmacological Interventions

We confirmed the presence of TRPA1 channels in DRG, spinal cord and cerebral cortex of murine nervous tissue [4,16,25,51–53]. The 1125 residue monomer was immunodetected in synaptosome-enriched fractions using affinity-purified antibodies against the N-terminal region and an extracellular sequence. The opioid receptors MOR and DOR are present in the cortex and dorsal horn (substantia gelatinosa) of the spinal cord; they are also expressed on cell bodies of the sensory neurons (DRG) and are transported to their central terminals in the superficial dorsal horn and to peripheral terminals in peripheral tissues [54,55]. We observed that immunoprecipitated MOR and DOR were accompanied by TRPA1-related signals (Figure 1B), suggesting that they form functional complexes in nervous tissue. Similarly, the NR1 subunit of NMDARs coprecipitated TRPA1 in the spinal cord. The immunosignals mostly appeared as a doublet at approximately 140 and 150 kDa (Figure 1A), which is probably due to the described pair of N-glycosylation sites in the external loop of human TRPA1, which is flanked by the transmembrane regions TM1 and TM2 (721–960) [56]. Computer analysis indicated this possibility for murine TRPA1 [57] and *in vitro*, PGNase F abolished the 150 kDa band augmenting the intensity of the expected 140 kDa (Figure 1B).

The plasticity of protein complexes in response to pharmacological interventions and/or physiological alterations usually indicates their functional relevance. This possibility was addressed by injecting morphine, MOR agonist, via intracerebroventricular (icv; first or second ventricles) and intraperitoneal (ip) routes and NMDA, an activator of glutamate NMDARs, via the icv route. Morphine, at the dosage used, injected via the icv or ip route promoted similar levels of antinociception, approximately 75% of the maximum measurable effect in the analgesic test. The effect of the opioid peaked sharply at 30 min after icv injection, while antinociception was more sustained, with a maximum between 30 and 60 min, after ip administration. On the other hand, icv NMDA diminished the antinociception produced by supraspinal icv morphine (Figure 2A). We observed that icv-injection of NMDA increased MOR-TRPA1 and NR1-TRPA1 associations at the cortical level and the spinal cord level. On the other hand, icv morphine increased *ex vivo* coprecipitation of MOR-TRPA1 complexes at the cortex level and diminished that of NR1-TRPA1 at the two levels of the nervous system studied. Morphine injected via the ip route mostly modified both associations at the cortical level (Figure 2B).

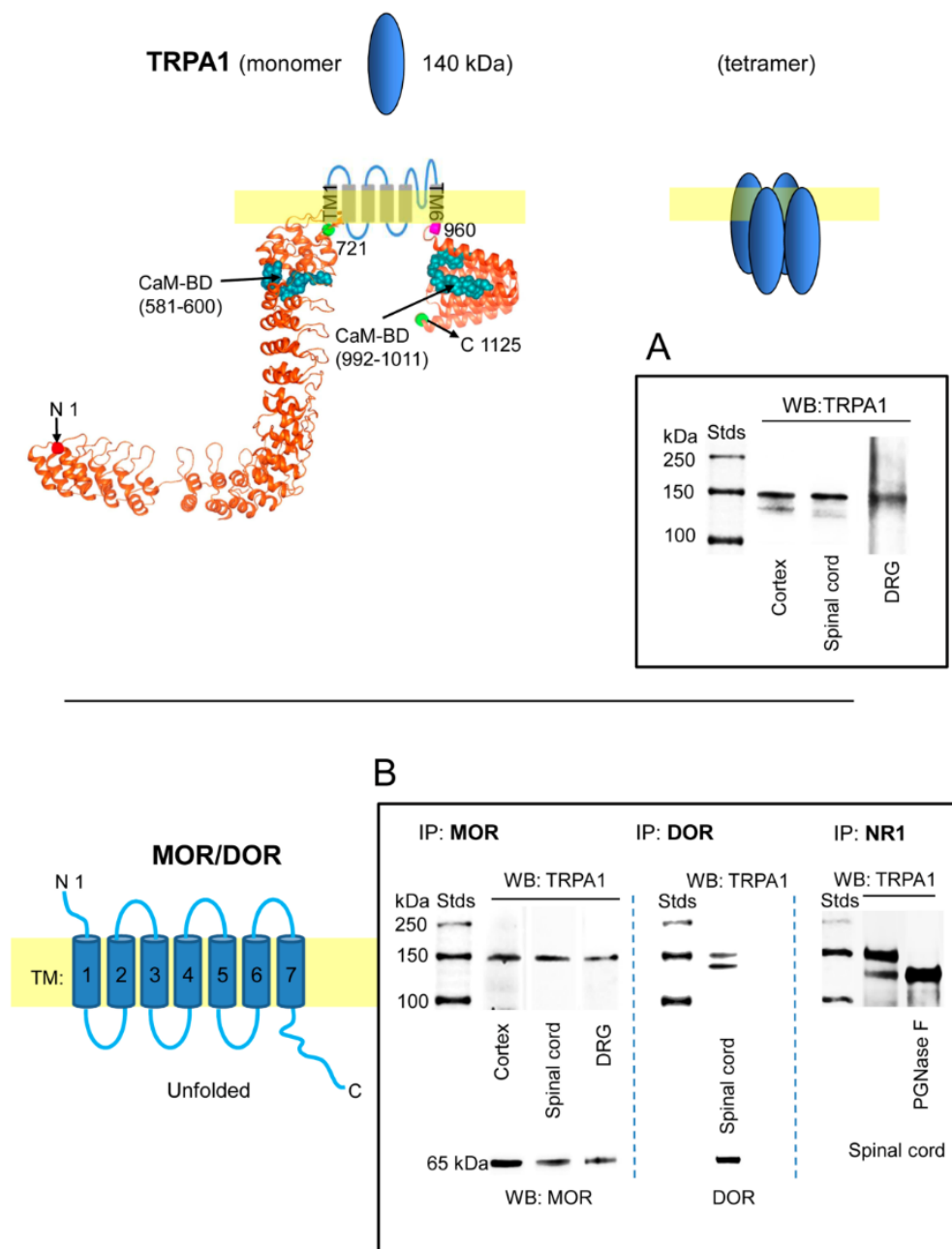


Figure 1. Expression of transient receptor potential ankyrin member 1 (TRPA1) channels in the cerebral cortex, spinal cord and dorsal root ganglia (DRG). TRPA1 association with mu-opioid receptors (MORs), delta-opioid receptors (DORs) and NR1 subunits. The structural model of the TRPA1 monomer was predicted by Novafold (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). The N- and C-terminal cytosolic sequences are linked by six transmembrane domains (TM). Ribbon model: The 3D structure of N- and C-terminal sequences shows the CaM-binding domains (BD) indicated by blue spheres. (A) Immunodetection of the TRPA1 monomer in synaptosomal fractions of murine cerebral cortex, spinal cord and dorsal root ganglia (DRG). (B) The membrane preparations were solubilized and the MOR, DOR and NR1 subunits of glutamate NMDARs were immunoprecipitated. The coprecipitation of the TRPA1 monomer was addressed by Western blotting. The expected size of the TRPA1 monomer is approximately 140 kDa; however, the immunosignals usually form a doublet of 140–150 kDa. The material associated with NR1 subunits was subjected to deglycosylation with PGNase F, which abolished the TRPA1 150 kDa band in favor of the 140 kDa band. Further details in Section 4.

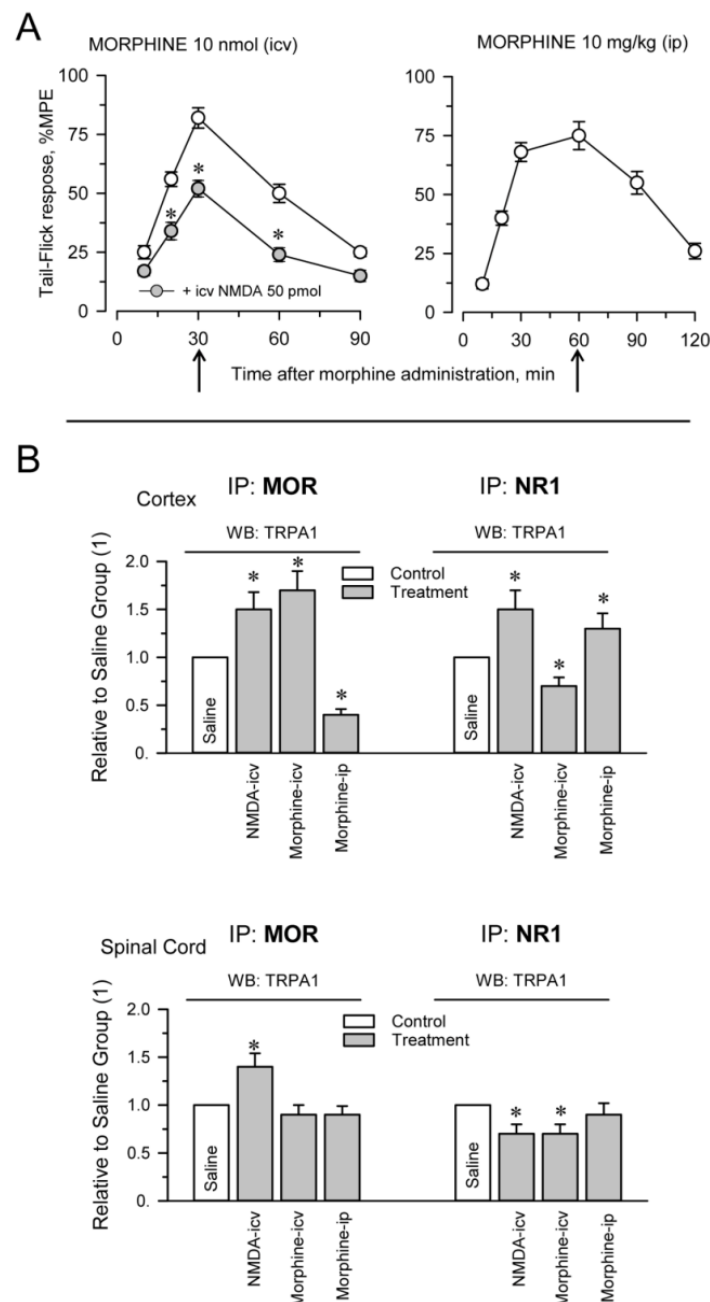


Figure 2. Pharmacological modulation of TRPA1 associations with MORs and glutamate NMDARs. Different groups of mice were icv-injected with saline, 50 pmol NMDA and 10 nmol morphine. Another group of mice received 10 mg/kg morphine via the ip route. **(A)** Antinociception promoted by morphine was determined in the warm water tail-flick test and is shown as a time-course. The effect of NMDA is shown relative to its antagonism of icv morphine analgesia. The points are the mean \pm SEM from groups of six mice. * Significant differences with respect to the group that received only morphine icv, $p < 0.05$. **(B)** Effect of pharmacological interventions on the associations of TRPA1 with MORs and NR1 subunits. Thirty minutes after the icv injections and 60 min after ip morphine (indicated by the arrows), the mice were killed and cortical and spinal cord synaptosomal fractions were prepared. Following solubilization of these membrane preparations, MORs and NR1 subunits were immunoprecipitated. The coprecipitated TRPA1 was detached from the bait proteins and the presence of the monomer was analyzed by Western blotting. For each association and structure, namely, the cerebral cortex and spinal cord, the data were referred to the control group that received saline and was assigned an arbitrary value of 1. The bars are the mean \pm SEM from two or three determinations. * Significant differences with respect to the control group, $p < 0.05$. Further details in Supplementary Materials Figure S4 and Section 4.

2.2. Inflammatory and Neuropathic Pain Alters TRPA1 Channel Association with MORs and NMDARs

The injection of formalin into the hind paw is widely used to evaluate the effects of analgesic compounds in laboratory animals. Intraplantar formalin excites sensory neurons by activating excitatory TRPA1 channels and this activity underlies the physiological and behavioral responses associated with this model of pain hypersensitivity, such as licking and biting responses [21,58]. The intraplantar injection of 0.5% formalin produced a biphasic behavioral reaction, with an initial phase lasting 5 min and a quiescent period, followed by a second less intense phase lasting from 10 to 25 min. Mice receiving saline, a solvent of formalin, did not show appreciable nociceptive-related responses during the time interval evaluated (Figure 3A). The mice did not exhibit pain-like behaviors toward the noninjected hind paw. We analyzed whether activation of TRPA1 channels on peripheral nerve terminals influences their association with MORs and NMDARs as well as the MOR-NR1 association in the spinal cord and DRG. Formalin almost completely abolished the MOR-NR1 association in DRG but increased this association in the spinal cord. The association of TRPA1 with MOR and NR1 subunits increased in the spinal cord and TRPA1-NR1 showed a tendency to augment in DRG (Figure 3B).

The influence of neuropathic pain on the association of TRPA1 channels with opioid receptors and NMDARs was also evaluated. Neuropathic pain was induced by chronic sciatic nerve constriction injury (CCI). The nerve-injured mice maintained a healthy appearance and were well groomed and their body weight decreased after surgery but returned to preoperative values within 2–4 days. Seven days after surgery, CCI mice but not sham-operated mice showed allodynia and on days 12 to 15, the nociceptive responses of CCI mice nearly returned to pre-surgery levels [59] (Figure 4A). The Sham and CCI mice were sacrificed on day 7 and the nervous structures were obtained for immunoprecipitation studies. Since cortical NMDAR-MORs associations remain unchanged in the murine CCI model of neuropathic pain [41], we analyzed the extent of their interaction in the pons-medulla and periaqueductal gray matter (PAG). We observed reductions in the MOR-TRPA1 association of $\geq 50\%$ in the pons-medulla, PAG and spinal cord. Similarly, the MOR-TRPA1 and NR1-TRPA1 associations were significantly diminished in the spinal cord of CCI mice (Figure 4B).

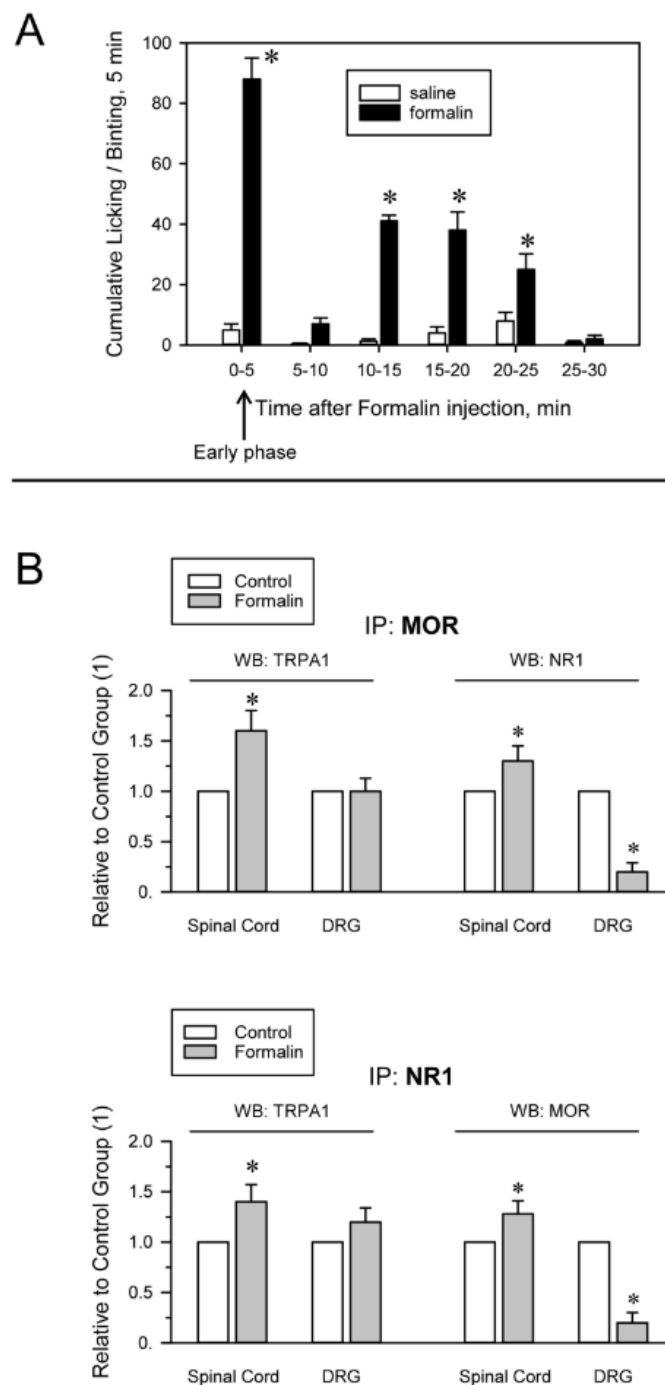


Figure 3. Formalin-induced inflammatory pain alters TRPA1 associations with MORs and NMDARs. (A) The mice received at time 0 an intraplantar injection of saline (control group) or 20 μ L of a 0.5% formalin solution into one of the hind paws. The time spent licking/biting was recorded every 5 min by a blinded observer. The bars are the mean \pm SEM from three determinations. * Indicates significant difference compared to the saline control group, $p < 0.05$. (B) The animals were sacrificed 5 min after the injection, when the early phase of formalin-induced pain had already peaked (indicated by the arrow). DRG and spinal cords were obtained. MORs and NR1 subunits were immunoprecipitated from the solubilized membrane preparations. At the end of the procedure, coprecipitated TRPA1 was detached from the bait proteins and analyzed by Western blotting * Indicates significant difference compared to the saline control group, $p < 0.05$. Further details in Figure 2, Supplementary Materials Figure S5 and Section 4.

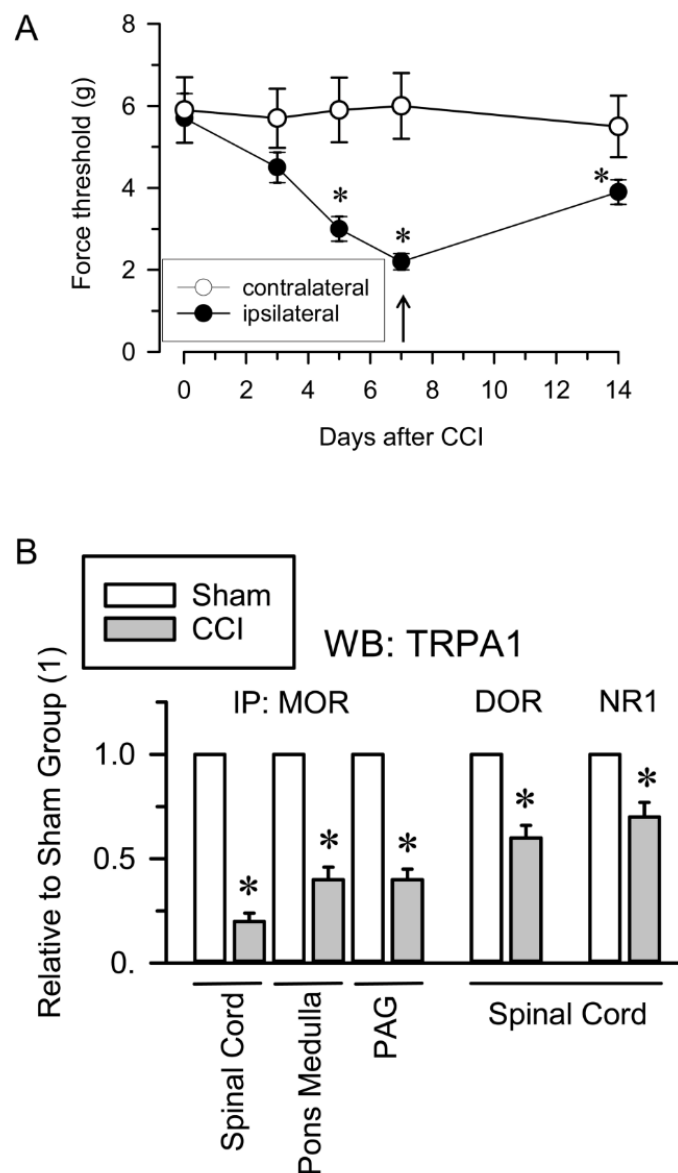


Figure 4. TRPA1 associations with opioid receptors and NMDARs in the CCI model of neuropathic pain. **(A)** Induction of mechanical allodynia. Chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve caused neuropathic pain in mice. The paw withdrawal thresholds of the contralateral and ipsilateral paws of the mice were measured before (indicated as 0) and 3, 5, 7 and 14 days after surgery. The force (in grams) at which the mice withdrew their paws in response to von Frey hair stimulation was determined as an index of mechanical allodynia. The data are the mean \pm SEM of six mice. * Indicates significant difference compared to the nociceptive threshold of the sham-operated control group on day 0 (7th after surgery); $p < 0.05$. **(B)** Seven days after surgery, sham and CCI mice were killed and synaptosomal fractions from different neural areas were obtained. The MOR, DOR and NR1 subunits were immunoprecipitated from the solubilized membrane preparations and coprecipitated TRPA1 was analyzed by Western blotting. * Indicates significant difference compared to the sham control group, $p < 0.05$. Further details in Figure 2, Supplementary Materials Figure S6 and Section 4.

Because NMDARs connect with MORs via HINT1 proteins and σ 1Rs [46,60], we explored this possibility for the associations of TRPA1 channels with MORs and NMDARs. We evaluated this possibility in P2 fractions from the spinal cords of HINT1^{-/-} and σ 1R^{-/-} mice. In these mice, the associations of TRPA1 with these proteins were comparable to those of the corresponding wild-type mice (Supplementary Materials Figure S1).

2.3. Calmodulin Mediates TRPA1 Channel Association with MORs and NR1 Subunits of Glutamate NMDARs

In *in vitro* assays, we observed that MOR does not bind to cytosolic TRPA1 Nt or Ct regions and that 3 mM CaCl_2 does not promote this association (Figure 5). In this paradigm, $\sigma 1\text{R}$ failed to couple TRPA1 Nt or Ct to the MOR and the HINT1 protein also failed to bridge MOR to TRPA1 Nt (Supplementary Materials Figure S2). Because HINT1 does not bind to TRPA1 Ct, this assay was not extended to this region [50]. However, in the presence of Ca^{2+} -activated CaM, TRPA1 Nt and Ct coupled to MORs (Figure 5). CaM binds to TRPA1 Ct in the absence of Ca^{2+} and this association increases at a physiological 3 mM concentration of Ca^{2+} [50]. Notably, the MOR-CaM interaction showed a similar pattern of dependence on Ca^{2+} and the MOR-TRPA1 Ct association was observed even in the absence of Ca^{2+} (Supplementary Materials Figure S3). The NR2A and NR2B subunits of NMDARs form stable associations with regulatory $\alpha 2\delta 1$ proteins [61], which may block the access of these subunits to TRPA1 channels. Thus, we evaluated the possibility that the cytosolic region of the NR1 subunit interacting with TRPA1 monomers. We observed that NR1 does not interact directly with TRPA1 Nt or Ct but in the presence of 3 mM Ca^{2+} , CaM facilitated these interactions (Figure 6).

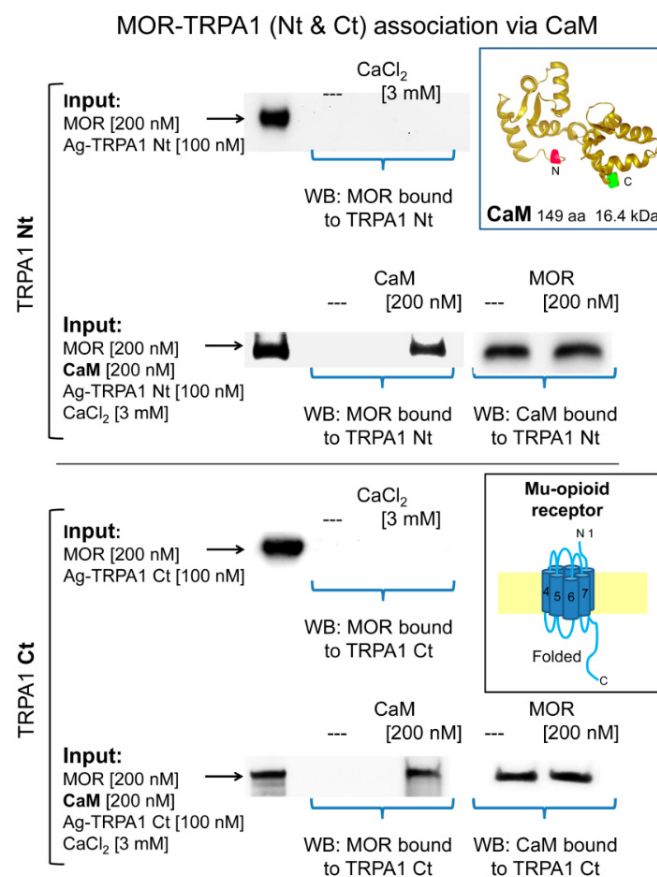


Figure 5. Calmodulin mediates the association of TRPA1 with MORs. The recombinant cytosolic Nt and Ct regions of TRPA1 were covalently attached to N-Hydroxysuccinimide (NHS)-agarose beads and then incubated with MOR in the absence and presence of 3 mM CaCl_2 . In another set of assays, the TRPA1 regions were sequentially incubated with calmodulin (CaM) and MORs in the presence of 3 mM CaCl_2 . At the end of the incubation, agarose-TRPA1 was recovered by several cycles of washing-resuspension and the bound proteins were detached with $2\times$ Laemmli buffer and resolved by SDS-PAGE followed by immunodetection. Further details in the Methods. Key: Input, Proteins incubated with agarose TRPA1, MORs are immunodetected; WB, immunodetected protein in Western blot.

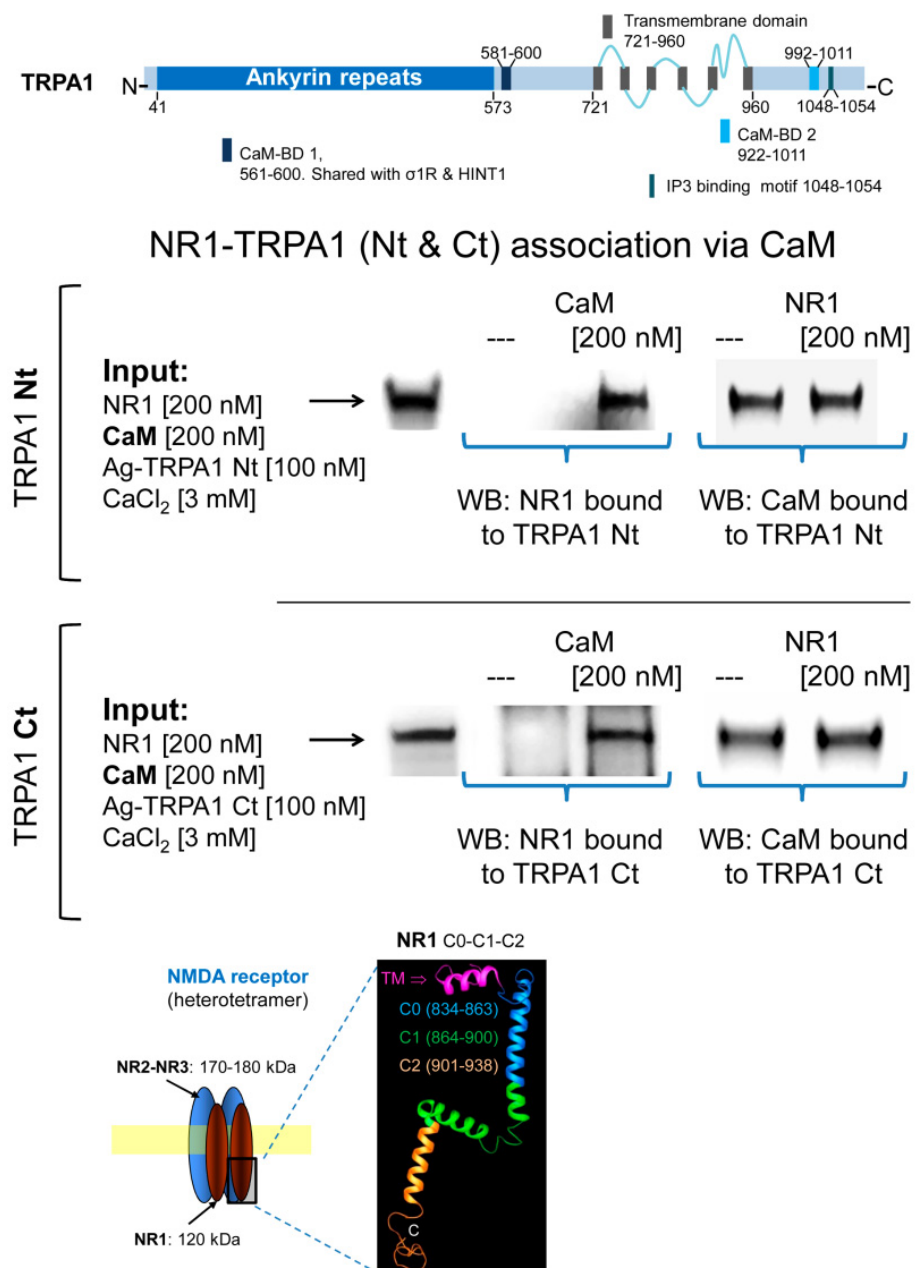


Figure 6. Calmodulin mediates the association of TRPA1 with NMDARs. Linear representation of TRPA1 monomer showing CaM- and IP3-binding domains (BD) [5]. Recombinant cytosolic Nt and Ct regions of TRPA1 were covalently attached to NHS-agarose beads and then were sequentially incubated with CaM and NR1 subunits of NMDARs in the presence of 3 mM CaCl₂ and 30 μ M of a peptide mapping the C1 region of NR1 subunit (879–888: TFRAITSTLA) [46]. CaM and NR1 associated with TRPA1 regions were detected by Western blotting. Details in Figure 5 and Section 4.

3. Discussion

This study suggests that a relationship exists between TRPA1 and glutamate NMDARs. Both cationic channels participate in the genesis of noxious signals, are functionally coupled to opioid receptors such as the MOR and form associations, which are modulated by their activity.

The TRPA1 channel was first cloned from human fetal lung fibroblasts and is also expressed in other types of nonneuronal cells, including keratinocytes, melanocytes, mast cells, odontoblasts, enterochromaffin cells and β -cells of the Langerhans islets [62–64].

In murine peripheral sensory neurons, TRPA1 is expressed in peptidergic (TRPV1+) neurons [4]. In the spinal dorsal horn, TRPA1 on the central terminals of peptidergic primary afferent nerve fibers regulates transmission to glutamatergic and GABAergic interneurons [12,15,16]. In the central nervous system, TRPA1 is also present in the somatosensory cortex, hippocampus, pons-medulla and spinal cord [52,53,65,66].

Our study identified the presence of TRPA1 channels in the synaptosomal fraction of murine frontal cortex, PAG, pons-medulla, spinal cord and DRG, where MORs and DORs are also expressed. The finding that TRPA1 and MOR/DOR coprecipitate suggests a functional relationship between the nociceptor channel and these antinociceptive G protein-coupled receptors (GPCRs). Glutamate NMDARs also associate with MORs via NR1 subunits of NMDARs that carry the regulatory cytosolic C1 segment [43]. This association is regulated by HINT1 proteins and σ 1Rs, with the latter competing with the NMDAR inhibitor CaM [47] for binding to NR1 subunits [44,46]. The activation of MORs recruits the activity of NMDARs, which exerts negative feedback on MOR signaling. This mechanism mostly operates for opioids such as morphine, which promotes limited internalization of MORs and mediates the short-term tolerance that follows the effects of high doses of opioids [48].

In the resting state, the association of MORs with NMDARs elevates the threshold for direct NMDAR activation and facilitates the recruitment of this glutamatergic activity in response to MOR signaling [43,48,60]. The MOR-NMDAR association is supported by HINT1 and σ 1Rs and accordingly, in mice lacking expression of these proteins, the MOR-NMDAR association greatly diminishes [44,67]. Our data indicate that TRPA1 does not couple to MORs or NMDARs via HINT1 or the σ 1R and thus the TRPA1-MOR and TRPA1-NR1 associations were maintained in neural P2 fractions obtained from HINT1^{-/-} and σ 1R^{-/-} mice. In *in vitro* assays, the HINT1 protein or σ 1R did not promote such associations but in the presence of CaM, the Nt and Ct cytosolic regions of TRPA1 coupled with the MOR and the NR1 subunit. The TRPA1 monomer binds HINT1, σ 1R and CaM via the N-terminal region and σ 1R and CaM but not HINT1 via the C-terminal region. Calcium promotes CaM and σ 1R binding to TRPA1 Nt and Ct but CaM also binds to TRPA1 Ct in the absence of Ca²⁺. Moreover, σ 1R competes with CaM at the TRPA1 Nt but promotes CaM binding to the Ct region [50]. The regulation of TRPA1 activity by CaM appears to be complex and thus, CaM mediates Ca²⁺-dependent potentiation and inactivation of the channel. TRPA1 contains a noncanonical CaM binding domain (CaMBD) in the C-terminal region, while the N-terminal region, which exhibits weak CaM binding, is critical for Ca²⁺-induced desensitization [68,69]. The CaMBD in the N-terminus is close to the linker domain and/or pre-S1 helix, regions structurally near the C-terminal CaMBD [5], which is consistent with previous studies demonstrating that extracellular Ca²⁺ regulates TRPA1 by acting through a channel site that needs to be very close to the channel pore [16]. Thus, the topology of the CaMBDs on TRPA1 makes the simultaneous interaction of CaM with the TRPA1 channel and cytosolic regions of the MOR and NR1 subunits of NMDARs feasible.

At low activation levels, MORs couple with NMDARs and TRPA1 channels and the activation of MORs promoted by *icv* morphine diminishes the MOR-NMDAR association [46] but enhances the MOR-TRPA1 association at the supraspinal level. Under low Ca²⁺ influx, TRPA1 Ct and MORs bind to CaM and thus, these signaling proteins may form basal complexes. The activation of TRPA1 channels, for example, by formalin, may augment CaM binding; hence, the MOR-TRPA1 association will increase, as observed for the spinal cord. When the MOR is activated, the interplay between σ 1R and CaM at the TRPA1 Nt will diminish CaM binding and thus the MOR association but at the TRPA1 Ct, σ 1R always promotes CaM binding, which supports MOR association. After *icv* morphine, the latter situation was observed at the cortical level but not at the spinal level, probably because *icv*-injected morphine barely reaches spinal MORs. On the other hand, *ip*-injected morphine produced the opposite effect, diminishing the MOR-TRPA1 association at the cortex but not at spinal level. Morphine, when injected by the systemic route, crosses the blood brain barrier but mostly acts at the peripheral and spinal levels [70]. The opioid

receptors, MOR and DOR, are present in the dorsal horn (substantia gelatinosa) of the spinal cord, cell bodies of sensory neurons (DRG), central terminals in the superficial dorsal horn and peripheral terminals in peripheral tissues [54,55]. Although, ip morphine did not alter TRPA1-MOR association in the spinal cord, the reduction in these complexes observed in the cortex may originate at the MORs located in sensory neurons reaching the upper areas through the neuromodulation of ascending pathways.

MOR-activated NMDARs participate in a negative feedback loop that dampens MOR signaling; however, there is no evidence that activated TRPA1 channels promote such an effect. On the other hand, GPCRs such as type 1 mGluR5 increase TRPA1 sensitivity and this regulation requires the activity of PKA and PKC on specific residues of the channel monomer [71]. Similarly, in DRG, bradykinin B2 and the PAR2 receptor can also stimulate TRPA1 function, probably via Gq/G11-PLC-PKC [51,72]. The TRPA1 residues identified as targets for PKA, PKC and Cdk5 phosphorylation are outside the CaMBDs [71,73,74] and thus should not interfere with CaM binding or CaM-mediated associations of the channel with additional partner proteins. In this scenario, MORs, by inhibiting sensory neuron excitability [75], may oppose TRPA1 channels; however, MOR activity may also contribute to TRPA1 activity via PKC, PKA and Cdk5 [48]. Indeed, the MOR can contribute zinc ions and nitric oxide (NO) to the regulation of TRPA1 channels. The C-terminal region of the MOR couples via HINT1 proteins to regulators of GTPase signaling (RGS) proteins 20 and 17 (RGSZ1 and RGSZ2), which carry zinc ions bound to cysteine rich domains (CRDs). In the MOR-mediated complex, the N-terminal region of neural nitric oxide synthase (nNOS) binds to these RGSZ proteins. Upon activation of MORs, nNOS generates NO and releases zinc ions from RGSZ CRDs [48,49]. Because, intracellular zinc ions activate TRPA1 through interactions with Cys641 and Cys1021 in the C-terminal fragment [76], MORs may increase TRPA1 activity, providing zinc ions but it may also reduce its activity by removing Cys-bound zinc ions via NO.

NMDARs are present on nociceptive primary afferents from the skin [77–79] and trigeminal ganglia [80]. Approximately 47% of unmyelinated peripheral axons are immunopositive for NMDARs and are believed to be involved in synaptic transmission between primary afferents and dorsal horn neurons [81,82]. NMDARs play a relevant role in central sensitization in spinal neurons and are also involved in the release of specific neurotransmitters during pain transmission at both the peripheral and central terminals of sensory neurons [83]. Thus, NMDA receptors may be involved in functionally divergent nociceptive systems [84]. The activation of MORs or the direct activation of NMDARs by icv NMDA brings about reductions in the MOR-NR1 association [43]. These situations recruit protein kinases such as PKC, PKA and CaMKII [48], which, via the phosphorylation of MOR cytosolic residues, exert negative feedback on opioid signaling and disrupt the MOR association with NMDARs. The binding of Ca^{2+} -CaM to NR1 reduces the probability of NMDAR channel opening, while phosphorylation of the NR1 cytosolic region by PKC and PKA blocks access to CaM, increases the binding of σ 1R and promotes NMDAR function [46,47].

In contrast, the interaction of the TRPA1 channel with MORs and NMDARs relies on CaM. Supraspinal administration of NMDA increased the MOR-TRPA1 association at the cortical and spinal levels and promoted or diminished NMDAR-TRPA1 associations at the cortical and spinal level, respectively. NMDA-activated NMDARs increase cytosolic Ca^{2+} and thus, may augment the binding of supraspinal TRPA1 channels with the aforementioned proteins via Ca^{2+} -activated CaM. This mechanism may trigger the changes observed at the spinal level via modulation of descending pathways, which finally affect TRPA1 association with MORs and NMDARs in the opposite direction. Formalin also brought about increases in TRPA1 association with MORs and NMDARs, particularly in the spinal cord and caused a great reduction in the MOR-NMDAR association in DRG, with values comparable to those produced by CCI in the spinal cord, pons-medulla and PAG [41]. These changes may be mediated by the activity of NMDARs and indeed, NMDAR antagonists attenuate formalin-induced pain behaviors [84], suggesting that the glutamatergic receptor

is necessary for TRPA1 nociceptive signals to propagate. The icv or ip activation of MORs also affected the association between TRPA1 and NMDARs, probably by recruiting the activity of NMDARs [43,46]. Morphine icv, reduced cortical and spinal TRPA1-NMDAR associations and ip morphine increased this association at the cortical level.

The associations of TRPA1 with these signaling proteins show a more uniform change profile as a consequence of neuropathic pain. Mechanical allodynia caused by CCI reduced the association of TRPA1 with MOR, DOR and NMDARs. Disruption of the MOR-NMDAR association is also observed in this animal model of neuropathy [41]. Thus, adaptive responses to the sustained overactivity of NMDARs “winding up” differ from those underlying acute pharmacological interventions and inflammatory formalin-induced pain. In summary, our study has shown the association of TRPA1 channels with MOR, DOR and NMDARs in different areas of the nervous system, as well as the plasticity of such associations in response to drugs and inflammatory and neuropathic pain. These findings may provide new avenues for understanding TRPA1 physiology in relation to signaling proteins relevant to pain perception.

4. Materials and Methods

4.1. Animal and Drugs

Male albino CD1 mice (ENVIGO, Horst, The Netherlands), homozygous ($\sigma 1R^{-/-}$) male sigma 1 receptor knockout mice, homozygous ($HINT1^{-/-}$) male HINT1 knockout mice and wild-type (WT) littermate mice were used in the study. The $\sigma 1R^{-/-}$ mice were backcrossed (N10 generation) onto a CD1 albino genetic background (ENVIGO, Milano, Italy). $HINT1^{-/-}$ mice with the genetic background from 129 mice were generously supplied by I.B. Weinstein/J.B. Wang and breeding in our animal facility. The mice used in these experiments were produced from heterozygous breeding pairs and assigned randomly to be used for the different experiments. The genotypes of the WT and KO mice were confirmed by PCR. All mouse housing, breeding and experimental protocols were performed in strict accordance with the guidelines of the European Community for the Care and Use of Laboratory Animals (Council Directive 2010/63/EU) and Spanish law (RD53/2013) regulating animal research. The use of drugs, experimental design and sample size determination were approved by the Ethical Committee for Research of the CSIC (SAF2015–65420 & CAM PROEX 225/14, 1 January 2019). The mice were maintained at 22 °C on a diurnal 12-h light/dark cycle and provided free access to food and water. To reduce the risk of social stress, mice from the same litter were grouped together and remained in these groups throughout the study. The mice were also provided extra space for comfort, as well as nesting material (e.g., soft paper and cardboard refuge) and small pieces of chewable wood. The mice were used when they were between the ages of 6 and 10 weeks. All attempts were made to minimize the number of mice used in each experiment.

The compounds used were as follows—morphine sulfate (Merck, Darmstadt, Germany); NMDA (0114, Tocris). The drugs were dissolved in saline. Doses and intervals were selected based on previous work [46,85]. To facilitate selective and straightforward access to their targets, the compounds were injected (4 μ L) into the lateral ventricles of mice as previously described [86]. Animals were lightly anesthetized and injections were performed with a 10 μ L Hamilton syringe at a depth of 3 mm at a point of 2 mm lateral and 2 mm caudal from the bregma. The 4 μ L were infused at a rate of 1 μ L every 5 s. After this the needle was maintained for an additional 10 s. Additionally, in a group of mice the administration of morphine was performed by the intraperitoneal (ip) route. Each group consisted of 6 to 8 animals and mice were randomly assigned to each treatment of the selected compounds.

4.2. Formalin-Induced Pain

The formalin test was performed as described with slight modifications [87]. Animals were allowed to habituate to the experimental room for at least 30 min; 20 μ L of a 0.5%

formalin solution (FO0011005P, Scharlau) or saline as a control, was injected into the plantar surface of the right hind paw. We selected this dose of formalin since it has been previously reported to selectively activate TRPA1 [88]. Immediately after intraplantar injection, the mouse was placed into a glass cylinder and observed. A small mirror was positioned behind the glass cylinder to allow clear observation of the paws. The time spent licking or biting the injected paw for 30 min (divided into six periods of 5 min each) after the injection was measured as an indicator of the pain response. For ex vivo assays, the animals were sacrificed 5 min after the injection of formalin or saline and the ipsilateral and contralateral L3-L4 DRGs and their corresponding spinal cord segments (dorsal T13-L1 sections) were collected.

4.3. Chronic Constriction Injury (CCI)

After testing mice for their basal mechanical sensitivity, CCI was performed under isoflurane/oxygen anesthesia [89] using a modification of the Bennett and Xie procedure [90]. Briefly, a 0.5-cm incision was made in the right mid thigh, the biceps femoris muscle was separated and the sciatic nerve was exposed proximal to its trifurcation. Two ligatures (5/0 braided silk suture; 70014, Lorca Marin, Murcia, Spain) were tied around this nerve approximately 1 mm apart until a short flick of the ipsilateral hind limb was observed. The incision was then closed in layers with a 4-0 Ethicon silk suture. The tactile pain thresholds of both the ipsilateral and contralateral hind paws were then assessed on different time interval post-surgery. The mice were individually placed in a transparent plastic cage with a wire mesh bottom that allowed full access to the paws. After a habituation period of 20 min, a mechanical stimulus was delivered to the plantar surface from below the floor of the test chamber to measure allodynia using an automatic von Frey apparatus (37450, Ugo Basile, Comerio, Italy). A steel rod (0.5 mm diameter) was pushed against the hind paw over a 10-s period as the force increased from 0 to 10 g. When the mouse withdrew its hind paw, the mechanical stimulus was automatically stopped and the force at which withdrawal occurred was recorded. Animals were sacrificed at the time interval allodynia peaked, which was observed seven days after surgery.

4.4. Immunoprecipitation and Western Blotting

The preparation of membrane and the immunoprecipitation assays were performed as described previously [91,92]. The specificity and efficacy of the antibodies used in immunoprecipitation assays have been addressed elsewhere [43,93]. Briefly, the cerebral structures were collected and homogenized in 10 volumes of 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 0.32 M sucrose supplemented with a 0.2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF). The homogenate was centrifuged at $1000\times g$ for 10 min to remove the nuclear fraction. The supernatant (S1) was centrifuged twice at $20,000\times g$ for 20 min to obtain the crude synaptosomal pellet (P2). The final pellet was diluted in Tris buffer supplemented with a 0.2 mM PMSF and a protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma, Madrid, Spain), then divided into aliquots and processed for protein determinations. For immunoprecipitation studies, about 800 μg of protein in the P2 pellet was solubilized by sonication at 4 °C (two cycles of 10 s each) in 2 mL volume containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, phosphatase inhibitor mixture (P2850, Sigma) and a protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma). Solubilization was continued overnight at 4 °C. The lysates were cleared with streptavidin agarose (17-5113-01, GE Healthcare) for 1 h at 4 °C. The solubilized proteins were then incubated overnight at 4 °C with affinity-purified biotinylated IgGs raised against MOR, DOR and NMDAR. The samples were incubated with streptavidin agarose for 2 h and then centrifuged for 5 min at $4300\times g$. The agarose pellets recovered were subjected to five cycles of washing and resuspension in Nonidet P-40 buffer, followed by centrifugation. To detach the immunocomplexes, the samples were heated with $2\times$ Laemmli buffer (1610737, Bio-Rad, Madrid, Spain) for 10 min at 100 °C. The mixture was cooled to room temperature and the streptavidin agarose was separated in a centrifugal filter with a pore size of 0.22 μm (Ultrafree-MC UFC30GV0S,

Merck-Millipore, Madrid, Spain). The immunocomplexes were recovered and resolved with SDS-PAGE electrophoresis in 10 cm × 10 cm × 1.5 mm gel slabs (10% total acrylamide concentration, 2.6% bisacrylamide cross-linker concentration). Separated proteins were then transferred onto 0.2 µm polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (162-0176, Bio-Rad) and probed overnight at 6 °C with the selected primary antibodies diluted in Tris-buffered saline pH 7.6 (TBS) + 0.05% Tween 20 (TTBS). Those were detected using secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase. The secondary antibodies were directed to the light IgG chains of the primary antibodies to preserve target immunosignals in the range 40 kDa-60 kDa. In parallel gel blots a fraction of the samples were loaded and bait proteins were detected. The secondary antibodies reacted primarily with the IgG light chains of the primary antibodies and of the accompanying antibodies used for immunoprecipitation. Thus, these signals when needed also provided a loading control for the samples in the gel. The *in vitro* assays using recombinant proteins did not require immunoprecipitation; thus, IgGs were excluded. To resolve the small proteins, we used 4–12% Bis-Tris gels (NP0341, Invitrogen, Fisher Scientific, Madrid, Spain) with MES SDS running buffer (NP0002, Invitrogen).

The western blot images and antibody binding were visualized by chemiluminescence (170-5061, Bio-Rad) and recorded using an ImageQuant™ LAS 500 (GE Healthcare). For each blot, the area containing the target protein was typically selected. The software automatically calculates the optimal exposure time for each of the specified areas to provide the highest possible signal to enable accurate quantification of the sample. Protein immunosignals were measured using the area of the strongest signal of each studied group of samples (average optical density of the pixels within the object area/mm²; AlphaEase FC software), the grey values of the means were then normalized within the 8 bit/256 grey levels [(256-computed value)/computed value].

The antibodies used for immunoprecipitation assays were directed towards amino acid sequences in the extracellular domains of the membrane receptors. The affinity purified IgGs against the extracellular domains of the MOR second external loop (EL) (205-216: MATTKYRQGSID; GenScript Co., Piscataway, NJ, USA), DOR first EL (110-120: METW-PFGELL; GenScript Co.) and the NMDAR NR1 subunit (483-496: KFGTQERVNNSNKK; GenScript Co.) were labeled with biotin following the manufacturer's instructions (21217; ThermoScientific). The primary antibodies used in Western blotting were as follows: anti-MOR Ct aa 387–398 (GenScript Co.); anti-DOR Nt aa 2-16 (GenScript Co.); anti-NMDAR NR1 (MAB1586, Merck-Millipore); anti-TRPA1 Nt (PAB11992, Abnova, Taipei City, Taiwan); anti-TRPA1 inner sequence (LS-C747641, LSBio, Seattle, WA, USA); anti-σ1R (42-3300, Invitrogen); anti-CaM (05-173, Merck-Millipore, Madrid, Spain); anti-HINT1 aa 93-106 (Immunostep, Salamanca, Spain).

4.5. PNGase F Digestion of Immunoprecipitated Proteins

The NR1 subunit was immunoprecipitated from the solubilized P2 fraction of the mouse spinal cord as described above. The agarose pellets underwent five cycles of washing, followed by centrifugation and resuspension in 1 mL of Nonidet P-40 buffer. At the end of this process, immune complexes were resuspended and solubilized in 100 mM NaH₂PO₄ (pH 7.7), 1 mM EDTA, 1% β-mercaptoethanol, 0.5% SDS and 1 mM dithiothreitol and heated at 100 °C for 10 min. The solubilized material was supplemented with 0.65% octylthioglucoside to help remove SDS from the proteins and then incubated with PNGase F (V4831, Promega, Madrid, Spain) for 18 h at 37 °C (5 units/10 µg of protein). The samples were then concentrated, solubilized in Laemmli buffer, separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel and blotted. The TRPA1 immunosignals were obtained.

4.6. Recombinant Proteins and In Vitro Interactions between Recombinant Proteins

The coding region of the N- and C-terminal regions of TRPA1 (NP_808449; residues 1–721 and 961–1125, respectively), the C-terminal region of MOR1 (AB047546; residues 286–398), the C0-C1-C2 region of the glutamate NMDAR NR1 subunit (NM_008169:

residues 834–938), the full-length murine σ 1R (AF004927) and HINT1 (NM_008248), were amplified by RT-PCR using total RNA isolated from the mouse brain as a template. Specific primers containing an upstream Sgf I restriction site and a downstream Pme I restriction site were used as described previously [46,50]. The PCR products were cloned downstream of the glutathione S-transferase (GST)/HaloTag[®] coding sequence (Flexi[®] Vector, Promega) and the tobacco etch virus (TEV) protease site and sequencing revealed that the sequences of the proteins were identical to the GenBank[™] sequences. The vectors were introduced into *E. coli* BL21 (KRX #L3002, Promega) and clones were selected on solid medium containing ampicillin. After 3 h of induction at room temperature (RT) in the presence of 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and 0.1% rhamnose, cells were collected by centrifugation and maintained at -80 °C. The fusion proteins were purified under native conditions on GStrap FF columns (17-5130-01, GE Healthcare) or with HaloLink Resin (G1915, Promega). When necessary, retained fusion proteins were cleaved on the column with ProTEV protease (V605A, Promega) and further purification was achieved by high-resolution ion exchange (780-0001, Enrich Q, BioRad). Sequences were confirmed by automated capillary sequencing. Recombinant calmodulin (208694, Merck-Millipore) was obtained from commercial sources.

The N- and C-terminal domains of TRPA1 were immobilized through covalent attachment to N-Hydroxysuccinimide (NHS)-activated Sepharose 4 fast flow (17-0906-01, GE) according to the manufacturer's instructions. The protein studied (200 nM) was then incubated with either NHS-blocked Sepharose 4FF (negative control) or with the immobilized TRPA1 sequence (100 nM) in 300 μ L of a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 0.2% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) in the presence of 3 mM CaCl₂. The samples were mixed by rotation for 30 min at RT and the proteins bound to TRPA1-Sepharose 4FF were recovered by centrifugation and washed three times. To study whether the MOR and NR1 subunits interacted with N- or C-terminal domains of TRPA1 via HINT1, σ 1R or CaM, the agarose-attached TRPA1-HINT1 complexes were incubated for a further 30 min at RT with rotation in the presence of MOR or NR1 (200 nM) in a reaction volume of 300 μ L of 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 3 mM CaCl₂ and 0.2% CHAPS. This protocol was also carried out to assess if σ 1R or CaM could be the link between MOR/NR1 and TRPA1. To facilitate the entrance of CaM into NR1 C1 this interaction was performed as described [46]. Agarose pellets containing the bound proteins were obtained by centrifugation and they were washed thrice in the presence of 3 mM CaCl₂, solubilized in 2 \times Laemmli buffer and analyzed by Western blotting.

4.7. Statistical Analyses

The Western blot data are expressed as the change in signal relative to that of the control group, which was assigned an arbitrary value of 1. Statistical analyses were performed using the Sigmaplot/SigmaStat v.14 package (Statistical Package For The Social Sciences (SPSS) Science Software, Erkrath, Germany) and $p < 0.05$ was considered to indicate significance. The data were analyzed using one-way ANOVA followed by the pairwise Holm-Sidak multiple comparison test.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/1/229/s1>, Figure S1: TRPA1 association with MORs in spinal cord in HINT1^{-/-} and σ 1R^{-/-} mice. Figure S2: The HINT1 protein or σ 1R does not support the MOR association with the Nt or Ct regions of TRPA1 channels. Figure S3: CaM mediates the TRPA1 Ct association with MOR in the absence of Ca²⁺. Figure S4: Pharmacological modulation of TRPA1 associations with MORs and glutamate NMDARs. Figure S5: Formalin-induced inflammatory pain alters TRPA1 associations with MORs and NMDARs. Figure S6: TRPA1 associations with opioid receptors and NMDARs in the CCI model of neuropathic pain.

Author Contributions: J.G.-N., E.C.-M. and M.R.-M. designed the research. J.G.-N. and E.C.-M. wrote the manuscript. J.G.-N., E.J.C. and P.S.-B. obtained the funding. E.C.-M., M.R.-M., M.C.R.-C. and P.S.-B. performed the experiments and the statistical analysis of data. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by MICINN Plan Nacional I+D+i [grant number RT 2018-093677-B-100] and the University of Granada [PPJIB2019.11]. E.C.-M. and M.C.R.-C. were supported by Grants from MEC [FPU 15/02356 and FPU16/03213].

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Cajal Institute, CSIC (protocol code CAM PROEX225/14, 01/01/2019).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or supplementary material.

Acknowledgments: We would like to thank Gabriela de Alba and María José López for their excellent technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare that all the research presented here was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Abbreviations

CaM	calmodulin
CCI	chronic contrition injury
CNS	central nervous system
DOR	delta-opioid receptor
DRG	dorsal root ganglia
HINT1	histidine triad nucleotide binding protein 1
MOR	mu-opioid receptor
NMDAR	N-methyl-D-aspartate acid glutamate receptor
σ 1R	type 1 sigma receptor
TRP	transient receptor potential calcium channel
TRPA1	transient receptor potential ankyrin member 1
WT	wild type

References

- Montell, C.; Birnbaumer, L.; Flockerzi, V. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* **2002**, *108*, 595–598. [[CrossRef](#)]
- Clapham, D.E. TRP channels as cellular sensors. *Nature* **2003**, *426*, 517–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nilius, B.; Flockerzi, V. Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels. In *Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2014; Volume 223, pp. v–vi.
- Story, G.M.; Peier, A.M.; Reeve, A.J.; Eid, S.R.; Mosbacher, J.; Hricik, T.R.; Earley, T.J.; Hergarden, A.C.; Andersson, D.A.; Hwang, S.W.; et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **2003**, *112*, 819–829. [[CrossRef](#)]
- Paulsen, C.E.; Armache, J.P.; Gao, Y.; Cheng, Y.; Julius, D. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* **2015**, *520*, 511–517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Latorre, R.; Brauchi, S.; Orta, G.; Zaelzer, C.; Vargas, G. ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium* **2007**, *42*, 427–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Caspani, O.; Heppenstall, P.A. TRPA1 and cold transduction: An unresolved issue? *J. Gen. Physiol.* **2009**, *133*, 245–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Basbaum, A.I.; Bautista, D.M.; Scherrer, G.; Julius, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* **2009**, *139*, 267–284. [[CrossRef](#)]
- Andrade, E.L.; Meotti, F.C.; Calixto, J.B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacol. Ther.* **2012**, *133*, 189–204. [[CrossRef](#)]
- Bautista, D.M.; Pellegrino, M.; Tsunozaki, M. TRPA1: A gatekeeper for inflammation. *Annu. Rev. Physiol.* **2013**, *75*, 181–200. [[CrossRef](#)]
- Julius, D. TRP channels and pain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2013**, *29*, 355–384. [[CrossRef](#)]
- Jordt, S.E.; Bautista, D.M.; Chuang, H.H.; McKemy, D.D.; Zygmunt, P.M.; Hogestatt, E.D.; Meng, I.D.; Julius, D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **2004**, *427*, 260–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Karashima, Y.; Damann, N.; Prenen, J.; Talavera, K.; Segal, A.; Voets, T.; Nilius, B. Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 9874–9884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kwan, K.Y.; Glazer, J.M.; Corey, D.P.; Rice, F.L.; Stucky, C.L. TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 4808–4819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Kobayashi, K.; Fukuoka, T.; Obata, K.; Yamanaka, H.; Dai, Y.; Tokunaga, A.; Noguchi, K. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with delta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J. Comp. Neurol.* **2005**, *493*, 596–606. [[CrossRef](#)]
16. Nagata, K.; Duggan, A.; Kumar, G.; Garcia-Anoveros, J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 4052–4061. [[CrossRef](#)]
17. Kosugi, M.; Nakatsuka, T.; Fujita, T.; Kuroda, Y.; Kumamoto, E. Activation of TRPA1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 4443–4451. [[CrossRef](#)]
18. Wrigley, P.J.; Jeong, H.J.; Vaughan, C.W. Primary afferents with TRPM8 and TRPA1 profiles target distinct subpopulations of rat superficial dorsal horn neurones. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 371–380. [[CrossRef](#)]
19. Eid, S.R.; Crown, E.D.; Moore, E.L.; Liang, H.A.; Choong, K.C.; Dima, S.; Henze, D.A.; Kane, S.A.; Urban, M.O. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol. Pain* **2008**, *4*, 48. [[CrossRef](#)]
20. Da Costa, D.S.; Meotti, F.C.; Andrade, E.L.; Leal, P.C.; Motta, E.M.; Calixto, J.B. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain* **2010**, *148*, 431–437. [[CrossRef](#)]
21. McNamara, C.R.; Mandel-Brehm, J.; Bautista, D.M.; Siemens, J.; Deranian, K.L.; Zhao, M.; Hayward, N.J.; Chong, J.A.; Julius, D.; Moran, M.M.; et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 13525–13530. [[CrossRef](#)]
22. Huang, K.; Bian, D.; Jiang, B.; Zhai, Q.; Gao, N.; Wang, R. TRPA1 contributed to the neuropathic pain induced by docetaxel treatment. *Cell Biochem. Funct.* **2017**, *35*, 141–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Trevisan, G.; Benemei, S.; Materazzi, S.; De, L.F.; De, S.G.; Fusi, C.; Fortes, R.M.; Coppi, E.; Marone, I.M.; Ferreira, J.; et al. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. *Brain* **2016**, *139*, 1361–1377. [[CrossRef](#)]
24. Obata, K.; Katsura, H.; Mizushima, T.; Yamanaka, H.; Kobayashi, K.; Dai, Y.; Fukuoka, T.; Tokunaga, A.; Tominaga, M.; Noguchi, K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 2393–2401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Maqboul, A.; Elsadek, B. A Novel Model of Cancer-Induced Peripheral Neuropathy and the Role of TRPA1 in Pain Transduction. *Pain Res. Manag.* **2017**, *2017*, 3517207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Dworkin, R.H.; Backonja, M.; Rowbotham, M.C.; Allen, R.R.; Argoff, C.R.; Bennett, G.J.; Bushnell, M.C.; Farrar, J.T.; Galer, B.S.; Haythornthwaite, J.A.; et al. Advances in neuropathic pain: Diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch. Neurol.* **2003**, *60*, 1524–1534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Staud, R.; Smitherman, M.L. Peripheral and central sensitization in fibromyalgia: Pathogenetic role. *Curr. Pain Headache Rep.* **2002**, *6*, 259–266. [[CrossRef](#)]
28. Mizoguchi, H.; Watanabe, C.; Yonezawa, A.; Sakurada, S. New therapy for neuropathic pain. *Int. Rev. Neurobiol.* **2009**, *85*, 249–260. [[CrossRef](#)]
29. Woolf, C.J.; Thompson, S.W. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* **1991**, *44*, 293–299. [[CrossRef](#)]
30. Liu, H.; Wang, H.; Sheng, M.; Jan, L.Y.; Jan, Y.N.; Basbaum, A.I. Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8383–8387. [[CrossRef](#)]
31. Marvizon, J.C.; McRoberts, J.A.; Ennes, H.S.; Song, B.; Wang, X.; Jinton, L.; Corneliussen, B.; Mayer, E.A. Two N-methyl-D-aspartate receptors in rat dorsal root ganglia with different subunit composition and localization. *J. Comp. Neurol.* **2002**, *446*, 325–341. [[CrossRef](#)]
32. Malcangio, M.; Fernandes, K.; Tomlinson, D.R. NMDA receptor activation modulates evoked release of substance P from rat spinal cord. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *125*, 1625–1626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Yaksh, T.L.; Jessell, T.M.; Gamse, R.; Mudge, A.W.; Leeman, S.E. Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord in vivo. *Nature* **1980**, *286*, 155–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kondo, I.; Marvizon, J.C.; Song, B.; Salgado, F.; Codeluppi, S.; Hua, X.Y.; Yaksh, T.L. Inhibition by spinal mu- and delta-opioid agonists of afferent-evoked substance P release. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 3651–3660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zachariou, V.; Goldstein, B.D. Delta-Opioid receptor modulation of the release of substance P-like immunoreactivity in the dorsal horn of the rat following mechanical or thermal noxious stimulation. *Brain Res.* **1996**, *736*, 305–314. [[CrossRef](#)]
36. Laulin, J.P.; Maurette, P.; Corcuff, J.B.; Rivat, C.; Chauvin, M.; Simonnet, G. The role of ketamine in preventing fentanyl-induced hyperalgesia and subsequent acute morphine tolerance. *Anesth. Analg.* **2002**, *94*, 1263–1269. [[CrossRef](#)]
37. Walwyn, W.M.; Chen, W.; Kim, H.; Minasyan, A.; Ennes, H.S.; McRoberts, J.A.; Marvizon, J.C. Sustained Suppression of Hyperalgesia during Latent Sensitization by mu-, delta-, and kappa-opioid receptors and alpha2A Adrenergic Receptors: Role of Constitutive Activity. *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 204–221. [[CrossRef](#)]
38. Pasternak, G.W.; Kolesnikov, Y.A.; Babey, A.M. Perspectives on the N-methyl-D-aspartate/nitric oxide cascade and opioid tolerance. *Neuropsychopharmacology* **1995**, *13*, 309–313. [[CrossRef](#)]
39. Trujillo, K.A. The neurobiology of opiate tolerance, dependence and sensitization: Mechanisms of NMDA receptor-dependent synaptic plasticity. *Neurotox. Res.* **2002**, *4*, 373–391. [[CrossRef](#)]
40. Przewlocki, R.; Przewlocka, B. Opioids in neuropathic pain. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 3013–3025. [[CrossRef](#)]

41. Sánchez-Blázquez, P.; Rodríguez-Muñoz, M.; Berrocoso, E.; Garzón, J. The plasticity of the association between mu-opioid receptor and glutamate ionotropic receptor N in opioid analgesic tolerance and neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *716*, 94–105. [[CrossRef](#)]
42. Wei, H.; Wu, H.Y.; Fan, H.; Li, T.F.; Ma, A.N.; Li, X.Y.; Wang, Y.X.; Pertovaara, A. Potential role of spinal TRPA1 channels in antinociceptive tolerance to spinally administered morphine. *Pharmacol. Rep.* **2016**, *68*, 472–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Rodríguez-Muñoz, M.; Sánchez-Blázquez, P.; Vicente-Sánchez, A.; Berrocoso, E.; Garzón, J. The mu-opioid receptor and the NMDA receptor associate in PAG neurons: Implications in pain control. *Neuropsychopharmacology* **2012**, *37*, 338–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Rodríguez-Muñoz, M.; Cortés-Montero, E.; Pozo-Rodríguez, A.; Sánchez-Blázquez, P.; Garzón-Niño, J. The ON:OFF switch, sigma1R-HINT1 protein, controls GPCR-NMDA receptor cross-regulation: Implications in neurological disorders. *Oncotarget* **2015**, *6*, 35458–35477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Chen, L.; Huang, L.Y. Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a mu opioid. *Neuron* **1991**, *7*, 319–326. [[CrossRef](#)]
46. Rodríguez-Muñoz, M.; Sánchez-Blázquez, P.; Herrero-Labrador, R.; Martínez-Murillo, R.; Merlos, M.; Vela, J.M.; Garzón, J. The sigma1 receptor engages the redox-regulated HINT1 protein to bring opioid analgesia under NMDA receptor negative control. *Antioxid. Redox Signal.* **2015**, *22*, 799–818. [[CrossRef](#)]
47. Ehlers, M.D.; Zhang, S.; Bernhardt, J.P.; Haganir, R.L. Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* **1996**, *84*, 745–755. [[CrossRef](#)]
48. Garzón, J.; Rodríguez-Muñoz, M.; Sánchez-Blázquez, P. Direct association of Mu-opioid and NMDA glutamate receptors supports their cross-regulation: Molecular implications for opioid tolerance. *Curr. Drug Abuse Rev.* **2012**, *5*, 199–226. [[CrossRef](#)]
49. Rodríguez-Muñoz, M.; Garzón, J. Nitric oxide and zinc-mediated protein assemblies involved in mu opioid receptor signaling. *Mol. Neurobiol.* **2013**, *48*, 769–782. [[CrossRef](#)]
50. Cortés-Montero, E.; Sánchez-Blázquez, P.; Onetti, Y.; Merlos, M.; Garzón, J. Ligands Exert Biased Activity to Regulate Sigma 1 Receptor Interactions With Cationic TRPA1, TRPV1, and TRPM8 Channels. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 634. [[CrossRef](#)]
51. Dai, Y.; Wang, S.; Tominaga, M.; Yamamoto, S.; Fukuoka, T.; Higashi, T.; Kobayashi, K.; Obata, K.; Yamanaka, H.; Noguchi, K. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 1979–1987. [[CrossRef](#)]
52. Kim, Y.S.; Son, J.Y.; Kim, T.H.; Paik, S.K.; Dai, Y.; Noguchi, K.; Ahn, D.K.; Bae, Y.C. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in the rat trigeminal sensory afferents and spinal dorsal horn. *J. Comp. Neurol.* **2010**, *518*, 687–698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kunert-Keil, C.; Bising, F.; Kruger, J.; Brinkmeier, H. Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genom.* **2006**, *7*, 159. [[CrossRef](#)]
54. Coggeshall, R.E.; Zhou, S.; Carlton, S.M. Opioid receptors on peripheral sensory axons. *Brain Res.* **1997**, *764*, 126–132. [[CrossRef](#)]
55. Truong, W.; Cheng, C.; Xu, Q.G.; Li, X.Q.; Zochodne, D.W. Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury. *Ann. Neurol.* **2003**, *53*, 366–375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Egan, T.J.; Acuna, M.A.; Zenobi-Wong, M.; Zeilhofer, H.U.; Urech, D. Effects of N-Glycosylation of the human cation channel TRPA1 on agonist-sensitivity. *Biosci. Rep.* **2016**, *36*, e00390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Taherzadeh, G.; Dehzangi, A.; Golchin, M.; Zhou, Y.; Campbell, M.P. SPRINT-Gly: Predicting N- and O-linked glycosylation sites of human and mouse proteins by using sequence and predicted structural properties. *Bioinformatics* **2019**, *35*, 4140–4146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. González-Cano, R.; Montilla-García, A.; Ruiz-Cantero, M.C.; Bravo-Caparros, I.; Tejada, M.A.; Nieto, F.R.; Cobos, E.J. The search for translational pain outcomes to refine analgesic development: Where did we come from and where are we going? *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2020**, *113*, 238–261. [[CrossRef](#)]
59. Sánchez-Blázquez, P.; Cortés-Montero, E.; Rodríguez-Muñoz, M.; Merlos, M.; Garzón-Niño, J. The Sigma 2 receptor promotes and the Sigma 1 receptor inhibits mu-opioid receptor-mediated antinociception. *Mol. Brain* **2020**, *13*, 150. [[CrossRef](#)]
60. Rodríguez-Muñoz, M.; Sánchez-Blázquez, P.; Vicente-Sánchez, A.; Bailon, C.; Martín-Aznar, B.; Garzón, J. The histidine triad nucleotide-binding protein 1 supports mu-opioid receptor-glutamate NMDA receptor cross-regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 2933–2949. [[CrossRef](#)]
61. Chen, J.; Li, L.; Chen, S.R.; Chen, H.; Xie, J.D.; Sirrieh, R.E.; MacLean, D.M.; Zhang, Y.; Zhou, M.H.; Jayaraman, V.; et al. The alpha2delta-1-NMDA Receptor Complex Is Critically Involved in Neuropathic Pain Development and Gabapentin Therapeutic Actions. *Cell Rep.* **2018**, *22*, 2307–2321. [[CrossRef](#)]
62. Mickle, A.D.; Shepherd, A.J.; Mohapatra, D.P. Sensory TRP channels: The key transducers of nociception and pain. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2015**, *131*, 73–118. [[CrossRef](#)]
63. Gouin, O.; L'Héroulle, K.; Lebonvallet, N.; Le Gall-Ianotto, C.; Sakka, M.; Buhe, V.; Plee-Gautier, E.; Carre, J.L.; Lefevre, L.; Misery, L.; et al. TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: Pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein Cell* **2017**, *8*, 644–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Nilius, B.; Appendino, G.; Owsianik, G. The transient receptor potential channel TRPA1: From gene to pathophysiology. *Pflug. Arch.* **2012**, *464*, 425–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

65. Tani, M.; Yazawa, I.; Ikeda, K.; Kawakami, K.; Onimaru, H. Long-lasting facilitation of respiratory rhythm by treatment with TRPA1 agonist, cinnamaldehyde. *J. Neurophysiol.* **2015**, *114*, 989–998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Kheradpezhoh, E.; Choy, J.M.C.; Daria, V.R.; Arabzadeh, E. TRPA1 expression and its functional activation in rodent cortex. *Open Biol.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Vicente-Sánchez, A.; Sánchez-Blázquez, P.; Rodríguez-Muñoz, M.; Garzón, J. HINT1 protein cooperates with cannabinoid 1 receptor to negatively regulate glutamate NMDA receptor activity. *Mol. Brain* **2013**, *6*, 42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Hasan, R.; Leeson-Payne, A.T.; Jaggar, J.H.; Zhang, X. Calmodulin is responsible for Ca(2+)-dependent regulation of TRPA1 Channels. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 45098. [[CrossRef](#)]
69. Cordero-Morales, J.F.; Gracheva, E.O.; Julius, D. Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, E1184–E1191. [[CrossRef](#)]
70. DeLander, G.E.; Portoghese, P.S.; Takemori, A.E. Role of spinal mu opioid receptors in the development of morphine tolerance and dependence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1984**, *231*, 91–96.
71. Brackley, A.D.; Gomez, R.; Guerrero, K.A.; Akopian, A.N.; Glucksman, M.J.; Du, J.; Carlton, S.M.; Jeske, N.A. A-Kinase Anchoring Protein 79/150 Scaffolds Transient Receptor Potential A 1 Phosphorylation and Sensitization by Metabotropic Glutamate Receptor Activation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1842. [[CrossRef](#)]
72. Maher, S.A.; Dubuis, E.D.; Belvisi, M.G. G-protein coupled receptors regulating cough. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2011**, *11*, 248–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Meents, J.E.; Fischer, M.J.; McNaughton, P.A. Sensitization of TRPA1 by Protein Kinase A. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Sulak, M.A.; Ghosh, M.; Sinharoy, P.; Andrei, S.R.; Damron, D.S. Modulation of TRPA1 channel activity by Cdk5 in sensory neurons. *Channels* **2018**, *12*, 65–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Stein, C.; Lang, L.J. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2009**, *9*, 3–8. [[CrossRef](#)]
76. Hu, H.; Bandell, M.; Petrus, M.J.; Zhu, M.X.; Patapoutian, A. Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 183–190. [[CrossRef](#)]
77. Carlton, S.M.; Hargrett, G.L.; Coggeshall, R.E. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Neurosci. Lett.* **1995**, *197*, 25–28. [[CrossRef](#)]
78. Coggeshall, R.E.; Carlton, S.M. Ultrastructural analysis of NMDA, AMPA, and kainate receptors on unmyelinated and myelinated axons in the periphery. *J. Comp. Neurol.* **1998**, *391*, 78–86. [[CrossRef](#)]
79. Kinkelin, I.; Brocker, E.B.; Koltzenburg, M.; Carlton, S.M. Localization of ionotropic glutamate receptors in peripheral axons of human skin. *Neurosci. Lett.* **2000**, *283*, 149–152. [[CrossRef](#)]
80. Lee, J.; Ro, J.Y. Differential regulation of glutamate receptors in trigeminal ganglia following masseter inflammation. *Neurosci. Lett.* **2007**, *421*, 91–95. [[CrossRef](#)]
81. Gerber, G.; Randic, M. Excitatory amino acid-mediated components of synaptically evoked input from dorsal roots to deep dorsal horn neurons in the rat spinal cord slice. *Neurosci. Lett.* **1989**, *106*, 211–219. [[CrossRef](#)]
82. Momiyama, A. Distinct synaptic and extrasynaptic NMDA receptors identified in dorsal horn neurones of the adult rat spinal cord. *J. Physiol.* **2000**, *523*, 621–628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. McRoberts, J.A.; Coutinho, S.V.; Marvizon, J.C.; Grady, E.F.; Tognetto, M.; Sengupta, J.N.; Ennes, H.S.; Chaban, V.V.; Amadesi, S.; Creminon, C.; et al. Role of peripheral N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in visceral nociception in rats. *Gastroenterology* **2001**, *120*, 1737–1748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Kristensen, J.D.; Karlsten, R.; Gordh, T.; Berge, O.G. The NMDA antagonist 3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid (CPP) has antinociceptive effect after intrathecal injection in the rat. *Pain* **1994**, *56*, 59–67. [[CrossRef](#)]
85. Garzón, J.; Rodríguez-Muñoz, M.; López-Fando, A.; Sánchez-Blázquez, P. The RGS22 protein exists in a complex with mu-opioid receptors and regulates the desensitizing capacity of Gz proteins. *Neuropsychopharmacology* **2005**, *30*, 1632–1648. [[CrossRef](#)]
86. Haley, T.J.; McCormick, W.G. Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1957**, *12*, 12–15. [[CrossRef](#)]
87. Tejada, M.A.; Montilla-García, A.; Cronin, S.J.; Cikes, D.; Sánchez-Fernández, C.; González-Cano, R.; Ruiz-Cantero, M.C.; Penninger, J.M.; Vela, J.M.; Baeyens, J.M.; et al. Sigma-1 receptors control immune-driven peripheral opioid analgesia during inflammation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 8396–8401. [[CrossRef](#)]
88. Braz, J.M.; Basbaum, A.I. Differential ATF3 expression in dorsal root ganglion neurons reveals the profile of primary afferents engaged by diverse noxious chemical stimuli. *Pain* **2010**, *150*, 290–301. [[CrossRef](#)]
89. Garzón, J.; Herrero-Labrador, R.; Rodríguez-Muñoz, M.; Shah, R.; Vicente-Sánchez, A.; Wagner, C.R.; Sánchez-Blázquez, P. HINT1 protein: A new therapeutic target to enhance opioid antinociception and block mechanical allodynia. *Neuropharmacology* **2015**, *89*, 412–423. [[CrossRef](#)]
90. Bennett, G.J.; Xie, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **1988**, *33*, 87–107. [[CrossRef](#)]
91. Garzón, J.; Rodríguez-Muñoz, M.; López-Fando, A.; Sánchez-Blázquez, P. Activation of mu-opioid receptors transfers control of Galpha subunits of the regulator of G-protein signaling RGS9-2: Role in receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 8951–8960. [[CrossRef](#)]

-
92. Rodríguez-Muñoz, M.; Torre-Madrid, E.; Sánchez-Blázquez, P.; Garzón, J. Morphine induces endocytosis of neuronal mu-opioid receptors through the sustained transfer of Galpha subunits to RGSZ2 proteins. *Mol. Pain* **2007**, *3*, 19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 93. Garzón, J.; Rodríguez-Muñoz, M.; Sánchez-Blázquez, P. Morphine alters the selective association between mu-opioid receptors and specific RGS proteins in mouse periaqueductal gray matter. *Neuropharmacology* **2005**, *48*, 853–868. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Human HINT1 Mutant Proteins that Cause Axonal Motor Neuropathy Exhibit Anomalous Interactions with Partner Proteins

Elsa Cortés-Montero¹ · María Rodríguez-Muñoz¹ · Pilar Sánchez-Blázquez¹ · Javier Garzón-Niño¹

Received: 17 June 2020 / Accepted: 16 December 2020

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC part of Springer Nature 2021

Abstract

The 14 kDa histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) is critical to maintain the normal function of motor neurons. Thus, a series of human HINT1 mutants cause autosomal recessive axonal neuropathy with neuromyotonia. HINT1 establishes a series of regulatory interactions with signaling proteins, some of which are enriched in motor neurons, such as the type 1 sigma receptor or intracellular domain (ICD) of transmembrane teneurin 1, both of which are also implicated in motor disturbances. In a previous study, we reported the capacity of HINT1 to remove the small ubiquitin-like modifier (SUMO) from a series of substrates and the influence of HINT1 mutants on this activity. We now report how human HINT1 mutations affect the interaction of HINT1 with the regulator of its SUMOylase activity, calcium-activated calmodulin, and its substrate SUMO. Moreover, HINT1 mutants exhibited anomalous interactions with G protein coupled receptors, such as the mu-opioid, and with glutamate *N*-methyl-D-aspartate receptors as well. Additionally, these HINT1 mutants showed impaired associations with transcriptional regulators such as the regulator of G protein signaling Z2 protein and the cleaved N-terminal ICD of teneurin 1. Thus, the altered enzymatic activity of human HINT1 mutants and their anomalous interactions with partner proteins may disrupt signaling pathways essential to the normal function of human motor neurons.

Keywords HINT1 · ARAN-NM · Type 1 sigma receptor · SUMO · NMDAR · ICD teneurin 1

Introduction

Histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) is highly phylogenically conserved [1] and belongs to the histidine triad (HIT) family. At the cellular level, this 14 kDa protein is ubiquitously expressed and in *in vitro* systems forms homodimers and exhibits purine phosphoramidase activity [2] hydrolyzing lysyl-AMP that is generated by lysyl-tRNA synthetase (LysRS) [3, 4]. HINT1 is under regulation by Redox mechanisms [5, 6] exhibiting zinc- and calmodulin (CaM)-regulated protease activity to remove small ubiquitin-like modifier (SUMO) from target proteins [7]. In recent years, a rare form of hereditary peripheral neuropathy named autosomal recessive axonal neuropathy with neuromyotonia (ARAN-NM) has convincingly being related to mutations in

the *HINT1* gene. These patients present muscle weakness, wasting, and sensory loss, which starts in the distal parts of the limbs and slowly progresses in a length-dependent manner [8, 9]. HINT1 neuropathy is worldwide distributed and is particularly prevalent in populations in central and southeastern Europe. To date, the majority of diagnosed individuals are of European origin, and among the 15 HINT1 mutations reported, the most common are R37P, C84R, and H112N [10]. Notably, *HINT1* mRNA levels in lymphoblasts from ARAN-NM-affected individuals were comparable to those in controls; however, only negligible expression of the mutated HINT1 proteins was detected [8]. In this sense, the targeted disruption of the *HINT1* gene does not promote neuropathy-related phenotypes [11]. These findings suggest that the function of human mutants is altered to the extent that it compromises the viability of motor neurons. This would lead to the metabolism of these abnormal proteins by proteasome.

HINT1 is widely expressed in the central nervous system and in other tissues [12, 13]. At the cellular level, this protein is found in the plasma membrane, cytoplasm, and nucleus [1]. HINT1 behaves as a scaffold and/or chaperone in its

✉ Javier Garzón-Niño
jgarzon@cajal.csic.es

¹ Neuropharmacology, Cajal Institute, Department of Translational Neuroscience, CSIC, Madrid, Spain

regulatory interactions with a variety of signaling proteins. HINT1 binds simultaneously to the cytosolic C-terminal of the mu-opioid receptor (MOR), to protein kinase C (PKC), and to regulators of G protein signaling (RGS) proteins of the Rz family, such as RGSZ1 and RGSZ2, when they are coupled to neural nitric oxide synthase (nNOS) [14, 15]. With the aid of nitric oxide (NO) from nNOS and zinc ions from cysteine-rich domains of RGSZ2 proteins [5, 16], HINT1 binds the regulatory domain of Raf-1 and conventional PKC γ and PKC α and inhibits their activity [16, 17]. HINT1 also binds to NR1 subunits of ionotropic glutamate *N*-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) [16, 18] and, together with type 1 of sigma receptors (σ 1Rs), coordinates the activity of G protein coupled receptors (GPCRs) with that of NMDARs [18].

HINT1 interacts in the plasma membrane and in the nucleus with potential transcription factors such as RGSZ2 [19, 20], the Pontin/Reptin complex [21], and the cleaved N-terminal intracellular domain (ICD) of transmembrane protein teneurin 1, which induces the activity of the microphthalmia-associated transcription factor [22]. Previous results show that HINT1 acts as a transcriptional repressor; it is recruited by the DNA damage response [23, 24], triggers apoptosis [25], and exhibits tumor-suppressive activity [26–28]. RGSZ2 and ICD teneurin 1 incorporate SUMO [7, 29], which modifies protein association and transcriptional regulation [30]. HINT1 removes SUMO from these proteins, and this SUMOylase activity appears to be altered in all the ARAN-NM-related HINT1 mutants described so far [7].

In this study, we investigated the interactions of human HINT1 mutants with SUMO and calcium-activated CaM, the substrate, and the regulator of HINT1 SUMOylase function, respectively. We also analyzed HINT1 binding to the C-terminal cytosolic regions of the MOR, to the NR1 subunit of glutamate NMDARs, to the RGSZ2 protein, and to ICD teneurin 1 and the σ 1R. A set of non-human HINT1 mutations provided more information about the association of HINT1 with these proteins. Our data indicate that the signaling proteins studied exhibit anomalous interactions with most human HINT1 mutants, which could contribute to their deregulation to finally causing ARAN-NM.

Materials and Methods

Recombinant Protein Expression

The coding region of human full-length HINT1 (NM_005340: residues 1–126) and its mutated sequences, full-length RGSZ2 (NM_019958.4: residues 1–210), the ICD region of teneurin 1 (NM_011855: residues 2–317), the C-terminal region of MOR1 (AB047546: residues 286–398), C0-C1-C2 region of the glutamate NMDAR NR1 subunit

(NM_008169: residues 834–938), and full-length σ 1R (AF004927: residues 1–223) were amplified by RT-PCR using total RNA isolated from the mouse brain as the template.

Specific primers containing an upstream Sgf I restriction site and a downstream Pme I restriction site were used, as described previously [16]. The PCR products were cloned downstream of the Glutathione S-transferase (GST) coding sequence (for NR1 and RGSZ2) or HaloTag coding sequence (for HINT1, MOR, σ 1R, and ICD teneurin 1) (Flexi® Vector, Promega) and the Tobacco Etch Virus (TEV) protease site. All the sequences were confirmed by automated capillary sequencing, and they were identical to the GenBank™ sequences. The vector was introduced into the *E. coli* BL21 (KRX #L3002, Promega), and clones were selected on solid medium containing ampicillin. After 3 h of induction at room temperature (RT) in the presence of 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and 0.1% rhamnose, the cells were collected by centrifugation and maintained at -80°C .

The GST fusion proteins were purified under native conditions on GSTrap FF columns (#17-5130-01, GE Healthcare), and further purification was achieved by high-resolution ion exchange (#780-0001 Enrich Q, BioRad). The HaloTag fusion proteins were purified under native conditions with HaloLink Resin (G1915, Promega), and they were cleaved in bulk with ProTEV protease (#V605A, Promega); further purification was achieved by high-resolution ion exchange chromatography (#780-0001 Enrich Q, BioRad). Sequences were confirmed by automated capillary sequencing.

In Vitro Interactions Between Recombinant Proteins: Pull-Down of Recombinant Proteins

The recombinant HINT1 protein (200 nM) or HINT1 mutants were incubated either with Sepharose 4B (#17-0120-01, GE Healthcare; negative control) or together with the immobilized proteins CaM-agarose 4B (#17-0529-01, GE Healthcare), SUMO1-agarose (#UL-740, Boston Biochem) or RGSZ2, ICD teneurin 1, σ 1R, the C-terminus of MOR1, and the C0-C1-C2 region of NMDAR NR1 subunit, which were covalent attached to NHS-activated Sepharose 4 fast flow (4FF, #17-0906-01, GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions.

The interactions were studied in 300 μL of a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 0.2% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) in the presence of 2.5 mM CaCl_2 and mixed by rotation for 30 min at RT. After incubation, the pellets were recovered by centrifugation, washed three times in the presence of 2.5 mM CaCl_2 , solubilized in 2x Laemmli buffer, and analyzed by Western blotting.

Western Blotting

The detached HINT1 proteins recovered in the aforementioned procedure were resolved with SDS-PAGE in 4–12% Bis-Tris gels (#NP0341, Invitrogen, Fisher Scientific), with MES SDS as the running buffer (#NP0002, Invitrogen). The proteins were transferred onto 0.2 μm PVDF membranes (#162-0176, BioRad) and probed overnight at 6 °C with anti-HINT1 antibody raised in rabbits (Immunostep) against the peptide sequence GYRMVVNEGADGGG (93–106). The primary antibody was diluted in Tris-buffered saline (pH 7.7) (TBS) + 0.05% Tween 20 (TTBS) and detected using the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, which was visualized by chemiluminescence (#170-5061, BioRad) and recorded on an ImageQuant™ LAS 500 (GE Healthcare). Because all the assays were performed with recombinant proteins, the immune-signals provided a single band of the expected size, which was used for the subsequent densitometry analysis. Accordingly, no other regions of the blots provided information and were routinely excluded from the analysis. The software automatically calculated the optimal exposure time for each blot to provide the strongest possible signal, from which the labelling could be accurately quantified. For each group of samples, protein immunosignals were measured using the area of the strongest signal (average optical density of the pixels within the object area/mm²; AlphaEase FC software). The gray values of the means were then normalized within the 8 bit/256 Gy levels [(256-computed value)/computed value].

Statistical Analyses

All graphs and statistical analyses were generated and made using the Sigmaplot/SigmaStat v.14 package (SPSS Science Software, Erkrath). Experiments were performed at least twice on separate experimental days. Western blot signals were expressed as the change relative to the controls (wild-type HINT1 interaction), which were assigned an arbitrary value of 1. Data using recombinant proteins were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Holm-Sidak multiple comparisons test. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

Results

Human HINT1 has 126 amino acids forming three helices, five β -sheets, and the rest linear sequences (DNASTAR NovaFold v15, Madison, USA). Currently, 15 HINT1 mutants have been reported to cause ARAN-NM, and protein analysis indicates that these mutants show limited localization in alpha helices (Fig. 1). The CaM-binding motif is located in the HINT1 N-terminal region (12–31 QPGGDTIFGKIIRKEIPAKI) [33]. In a β -sheet

close to the C-terminus, a series of hydrophobic amino acids (110–116: HIHLHVL) interweave to form the HIT and a typical SUMO-interacting motif (SIM) [34] (Fig. 1a).

HINT1 SUMOylase activity is triggered by calcium-activated CaM and/or NO [7], and in *in vitro*, HINT1 binds calcium-activated CaM and SUMO1 [7]. All but the shortest HINT1 mutant Q62* were included in the study (Supplemental Fig. 9). Human HINT1 mutants R37P and G93D behaved as the wild-type in their interaction with SUMO1, the G89V greatly increased its association, while the other human mutants mostly reduced their interactions with this protein (Fig. 2a; Supplemental Fig. 2). Non-human HINT1 mutants targeting the HINT1 SIM domain V115D and L116Q [7] showed weak associations with SUMO1 (Supplemental Fig. 10), thus confirming the relevance of the SIM domain in HINT1 binding to SUMO proteins.

The human HINT1 mutants C38R and mostly C84R and G89V increased HINT1-CaM association. Non-human mutants, C84S and D87V, also increased this HINT1 interaction suggesting a role for HINT1 84–89 region in the interaction between these proteins. The other human HINT1 mutants reduced their interactions with CaM and the non-human T17A mutant located in the CaM-binding motif abolished this association [7] (Fig. 2b; Supplemental Fig. 10). While human HINT1 mutations H112N and H114R (HIT domain) reduced their interaction with CaM, non-human HINT1 mutants V115D and L116Q (SIM domain) greatly stabilized HINT1-CaM association (Supplemental Figs. 3 and 10).

HINT1 directly associates with the cytosolic C0-C1-C2 region of the NR1 subunit of the glutamate NMDA receptor. In this scenario, human HINT1 mutants showed diminished interactions with this NR1 subunit, except of C38R and G89V mutants, which exhibited a strong and a very strong association, respectively, with this protein. Human and non-human HINT1 mutations in C38 and C84 produced similar effects, and these in the HIT and SIM domains practically abolished this interaction (Fig. 3a; Supplemental Figs. 4 and 10). HINT1 binds to an amino acid sequence at the beginning of the MOR C terminal cytosolic tail [35], which comprises the 354–357 (TSST) cluster. As observed for the association of HINT1 mutants with NR1 subunits, all but G89V diminished their binding to the MOR C-terminal sequence (Fig. 3b; Supplemental Fig. 5). Thus, NR1 and MOR Ct may share HINT1 binding surface, and in fact *ex vivo* assays suggested this possibility [18].

The RGSZ2 protein is a sumoylated regulator of G protein signaling and is found in the plasma membrane and in the nucleus [29]. HINT1 exhibits *in vitro* isopeptidase activity on sumoylated RGSZ2 [7] and forms stable complexes with RGSZ2 in the C-terminal region of the MOR [35]. Human HINT1 mutants showed a disparate pattern of interacting with RGSZ2, while some exhibited a strengthened association (C38R, G89V, etc.), other mutants interacted weakly with

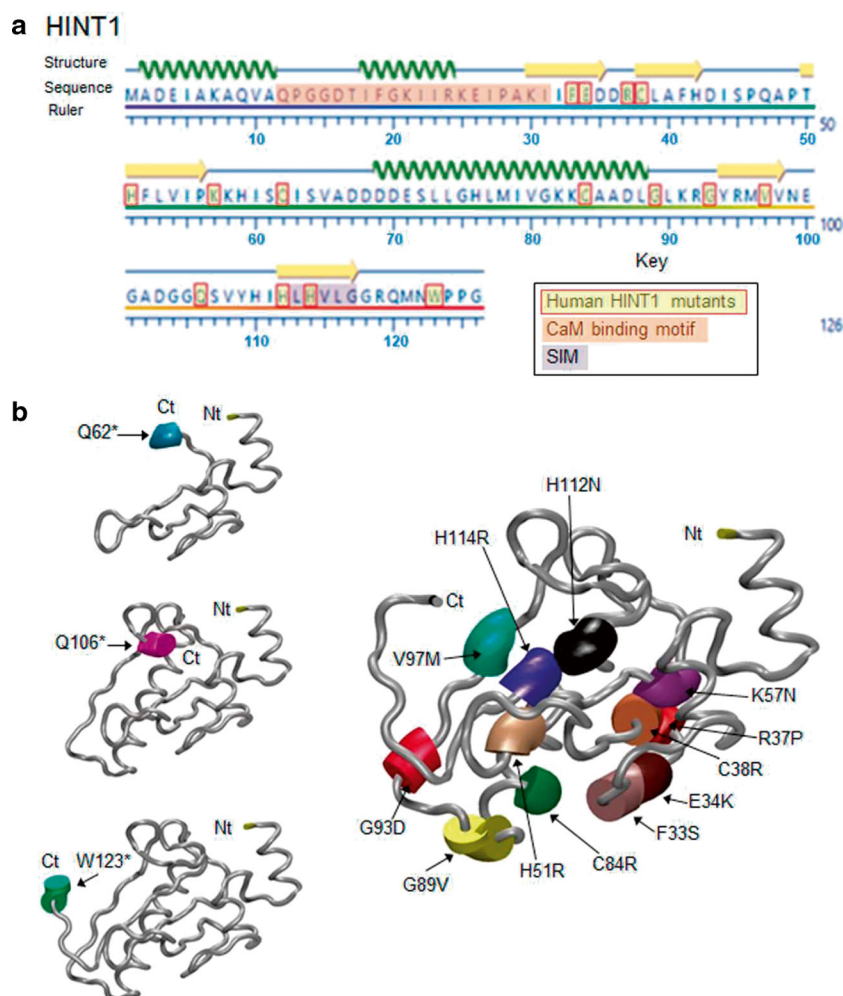


Fig. 1 Secondary structure and 3D model of HINT1 protomer. The HINT1 protein forms homodimers in *in vitro* assays [31, 32]; however, this is not seen for several human HINT1 mutants [32]. Thus, for the sake of simplicity, the mutations of the HINT1 proteins are shown on the monomer. **(a)** Protein sequence and secondary structure of HINT1 protomer with helices represented as green waves and β -sheets as yellow arrows. HINT1 protein contains a putative CaM-binding motif (12–31) and a SUMO interacting motif (SIM) (110–116). The amino acids changed in the human HINT1 mutants causing ARAN-NM are indicated. **(b)** HINT1 3D structure shows the mutated amino acids causing ARAN-

NM as colored tube occupancy. Left panel: human HINT1 truncating mutations Q62*, Q106*, and W123*. Right panel: the missense human HINT1 mutations. HINT1 structural model shown herein and its secondary structure were constructed by Novafold (DNASTAR, Inc., Madison, WI). Inset: The HINT1 3D structure is shown as a tube with reference amino acids as colored cylinders (tube occupancy). 3D, three-dimensional; CaM, calmodulin; HINT1, histidine triad nucleotide-binding protein 1; SIM, SUMO interacting motif; SUMO, small ubiquitin-like modifier

RGSZ2 proteins. Human and non-human HINT1 mutants at C38 and C84 produced increases in this association. Human mutants at HIT domain, H112N and H114R, diminished HINT1-RGSZ2 interactions, and non-human V115D and L116Q (SIM domain) enhanced their interaction (Fig. 4; Supplemental Figs. 6 and 10).

Protein analysis revealed the almost absence of secondary structure in ICD teneurin 1 (Fig. 5). This protein interacts with HINT1, while calcium promotes and calcium-activated CaM diminishes this association [7]. Human HINT1 mutant proteins showed mostly weakened associations with ICD

teneurin 1. As observed above for HINT1-CaM interaction, C84R and G89V increased their interaction with ICD teneurin 1 as also did non-human mutants, C84S and D87V. Thus HINT1 84–89 region may be shared by CaM and ICD teneurin1 in their binding to HINT1. Disruption of HIT domain also diminished this interaction (Fig. 5; Supplemental Figs. 7 and 10).

The association of HINT1 with σ 1R is weak [18], and exception of C38R and G89V, most human HINT1 mutants exhibited even weaker interactions with the σ 1R. Disruption of HIT and SIM domains caused similar changes to these

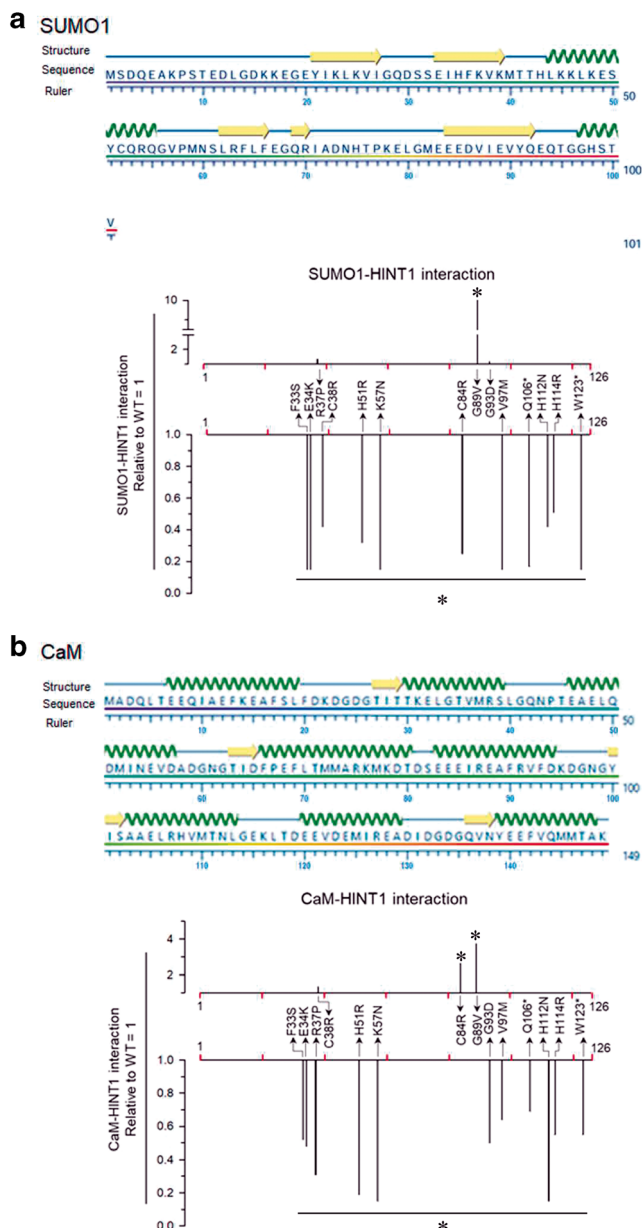


Fig. 2 Altered binding of human HINT1 mutants to SUMO1 and calcium-activated CaM. (a) Secondary structure of SUMO1 and graphical representation of binding of different HINT1 mutants to SUMO1 and (b) CaM. Sequence of SUMO1 and of CaM showing their secondary structure with helices represented as green waves and β -sheets as yellow arrows. In vitro assay: recombinant SUMO1 (100 nM) or CaM (100 nM) covalently attached to agarose was incubated in the presence of 2.5 mM CaCl_2 with 200 nM HINT1 wild-type (WT) or the corresponding HINT1 mutant. Prey proteins alone did not bind to the agarose (negative control). The agarose pellets were processed as described in the Methods, and the recovered HINT1 proteins were measured by Western blotting (see the Methods section; Supplemental Fig. 1). The assays were repeated at least twice, producing comparable results. For each interaction of HINT1 wild-type or human mutant, SUMO1-HINT1 and CaM-HINT1, binding was analyzed using ANOVA followed by the Holm-Sidak multiple comparisons test. * Indicates significantly different compared to the HINT1 WT control group, $p < 0.05$. Further details of the assay, immunoblot detection in Methods and supplemental Figs. 1, 2, and 3. CaM, calmodulin; SUMO, small ubiquitin-like modifier; WT, wild-type. Data of HINT1 human mutants are shown relative to the data obtained using the HINT1 WT with an arbitrary value of 1

RGSZ2, which is implicated in GPCR signaling via G proteins, and ICD teneurin 1, which bind to HINT1 for transportation from the plasma membrane to the nucleus, GPCRs such as MOR and ionotropic glutamate NMDAR, both of which are regulated by HINT1 and $\sigma 1R$ [18, 35]. With a few exceptions, the human HINT1 mutant proteins showed reduced associations with the analyzed proteins compared with the HINT1 wild-type. Initially, crystallization studies revealed that HINT1 forms a homodimer with protomers interacting through their C-terminal sequences [31]. Subsequently, in vitro studies with the purified protein also confirmed its dimeric organization [32]. In the nucleus, HINT1 inhibits the transcription of target genes [36], forms a stable association with the Pontin/Reptin complex to inhibit the β -catenin transcriptional pathway [21, 37], and forms complexes with lysyl-tRNA synthetase (LysRS) and transcription factors such as MITF or USF2 [38, 39]. HINT1 displays nucleoside phosphoramidase/acyl-AMP hydrolase activity and SUMO protease activity [2, 7]. While the known ARAN-NM-related human HINT1 mutants lack or exhibit a deregulated isopeptidase activity [7], analysis of 5 human HINT1 mutants indicated alterations in their nucleoside phosphoramidase activity and/or in their capacity to form the dimer in vitro [32]. Thus, in vivo conversion of HINT1 from a homodimer to monomer, or a significant reduction of the enzyme's catalytic efficiency [7, 32] probably contributes to the development of ARAN-NM. These studies suggest that in mature neuronal cells, HINT1 may exist as a monomer and homodimer, and even through its interaction with other proteins, it may result in heterodimers. The physiological regulation of such processes deserves further research.

In wild-type HINT1, isopeptidase activity is prevented by zinc ions binding to Cys84 in the catalytic domain and promoted by their removal by calcium-CaM or NO [40, 41]. The

observed for ICD teneurin 1-HINT1 (Fig. 6; Supplemental Figs. 8 and 10).

Discussion

Because, the phylogenetically conserved HINT1 protein participates in a series of physiological processes at the plasma membrane, in the cytosol and in the nucleus, HINT1-regulated signaling pathways may be substantially altered by the mutations that cause ARAN-NM. Our present study shows that human HINT1 mutants exhibit anomalous interactions with a series of signaling proteins that interact in vivo with the wild-type form (see Introduction). These proteins include CaM, which regulates HINT1 SUMO protease activity,

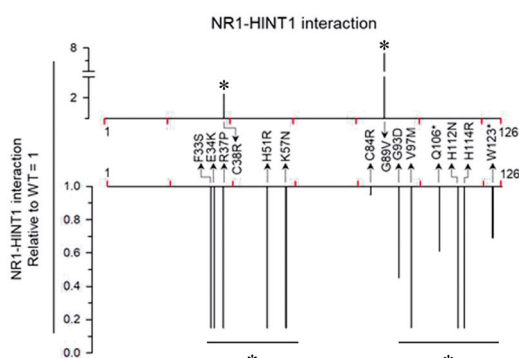
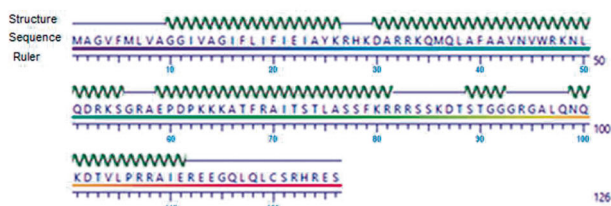
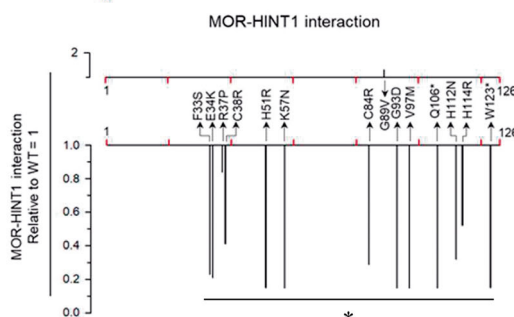
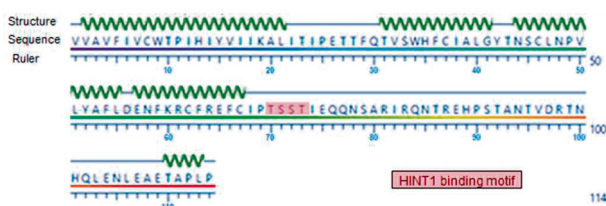
a C0-C1-C2 of NR1**b** C-terminal of MOR

Fig. 3 Altered binding of human HINT1 mutants to the NMDAR NR1 subunit and C-terminus of MOR. **(a)** Sequence of the cytosolic C-terminal region C0-C1-C2 of the NMDAR NR1 subunit showing its secondary structure. Graphical representation of the binding of HINT1 WT and mutants to NR1 subunits of the glutamate NMDA receptor. **(b)** Secondary structure of the C-terminus of MOR and graphical representation of the binding of HINT1 WT and HINT1 mutants to this region of the MOR. Recombinant cytosolic C0-C1-C2 region of the NMDAR NR1 subunit or MOR Ct region (100 nM) was covalently attached to agarose and incubated with HINT1 WT or the mutants (200 nM) in the presence of 2.5 mM CaCl_2 (details as in Fig. 2). Further details of immunoblot detection in Methods and supplemental Figs. 4 and 5. MOR, mu-opioid receptor; NMDAR, *N*-methyl-D-aspartate receptor; WT, wild-type

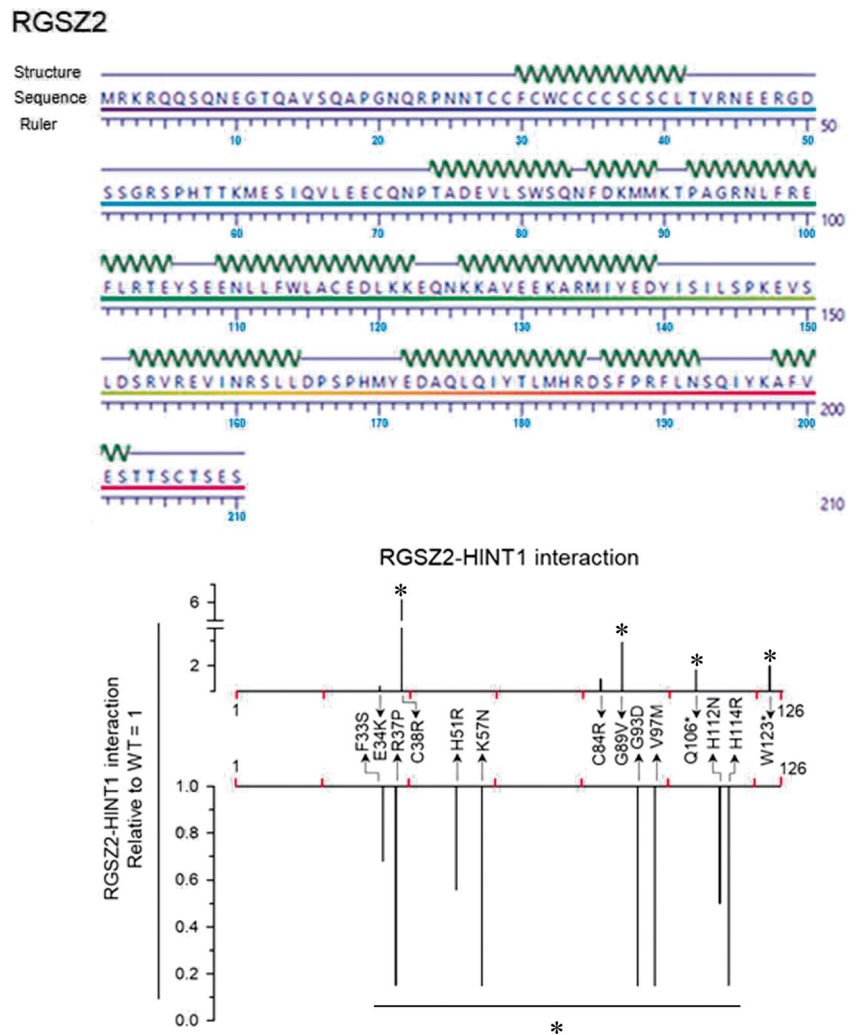
activation, which releases zinc bound to Cys84 [7]. The availability of NO necessary to disrupt the zinc-Cys84 interaction is facilitated by the colocalization of HINT1 with nNOS in the MOR environment in which HINT1 is associated with RGS2–nNOS complexes [42]. HINT1 protease activity is altered in all human HINT1 mutants, which exhibit mostly weak interactions with CaM and the substrate SUMO. HINT1 phosphoramidase activity is also altered in the five human mutants evaluated [32]. Thus, both HINT1 enzymatic activities may share critical amino acid residues at the catalytic site [2, 7, 32]. Notwithstanding, the H112N HINT1 mutant triggers apoptosis independent of its enzymatic activity [25]. Thus, the proapoptotic and tumor-suppressive role of HINT1 may reside in its regulatory interaction with third partner proteins. We may consider that human HINT1 mutations are distributed into two arbitrary regions of the sequence, the first cluster from F33S to K57N and the second from C84R to W123*. Some of the mutations within the first region result in isopeptidase activity, albeit deregulated; however, none of the mutations in the second cluster exhibit this activity [7]. The second region contains the catalytic Cys84-Asp87-His114 core and the conserved HIT domain, which alternates with the hydrophobic amino acids of the SIM.

The HINT1 protein in the plasma membrane also behaves as a scaffold and binds simultaneously to cytosolic regions of GPCRs such as MOR [42], protein kinases such as PKC γ and PKC α , Raf-1 [6, 43], and proteins of the RGS family (RGSZ1 and RGSZ2) [15, 35]. HINT1 competes with calcium-activated CaM and σ 1R for their binding to the cytosolic C0-C1-C2 region of NR1 subunits of neural glutamate NMDAR [16]. As a result, σ 1Rs promote NMDAR activity, while HINT1 and CaM diminish this activity [44]. A tight functional relationship exists between HINT1 and σ 1R in the neural membrane. The interplay between these proteins promotes physical coupling and uncoupling between MOR and the NR1 subunit of NMDAR [18]. Indeed, in mice lacking HINT1 or σ 1R, the functional regulation between MOR and NMDAR is lost, morphine does not recruit NMDAR function, and the direct activation of NMDARs does not reduce morphine analgesia [16, 35].

Our study indicates that except for a pair of mutations, human HINT1 mutant proteins bind poorly to σ 1Rs, MORs, and NMDAR NR1 subunits. Thus, G89V and C38R mostly increased HINT1 associations with these proteins; however, these mutants exhibit an impaired or deregulated SUMOylase activity [7]. HINT1 regulation of NMDARs may be relevant to the development of ARAN-NM. In this context, human HINT1 mutants deregulate NMDAR interactions with other signaling proteins contributing to neurological disorders, including neurodegenerative diseases [45], and probably alterations in motor coordination. In fact, the progression of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is

N-terminal region of HINT1 binds CaM, and accordingly the non-human T17A mutation prevents the CaM-mediated activation of HINT1 SUMOylase activity but not NO-mediated

Fig. 4 Altered binding of human HINT1 mutants to RGSZ2. Sequence of the RGSZ2 protein showing its secondary structure and graphical representation of the association of human HINT1 mutants with RGSZ2 protein. Recombinant RGSZ2 (100 nM) covalently attached to agarose was incubated with HINT1 WT or the corresponding mutant (200 nM) in the presence of 2.5 mM CaCl₂ (details as in Fig. 2). Further details of immunoblot detection in Methods and supplemental Fig. 6. RGSZ2, regulator of G protein signaling Z2; WT, wild-type



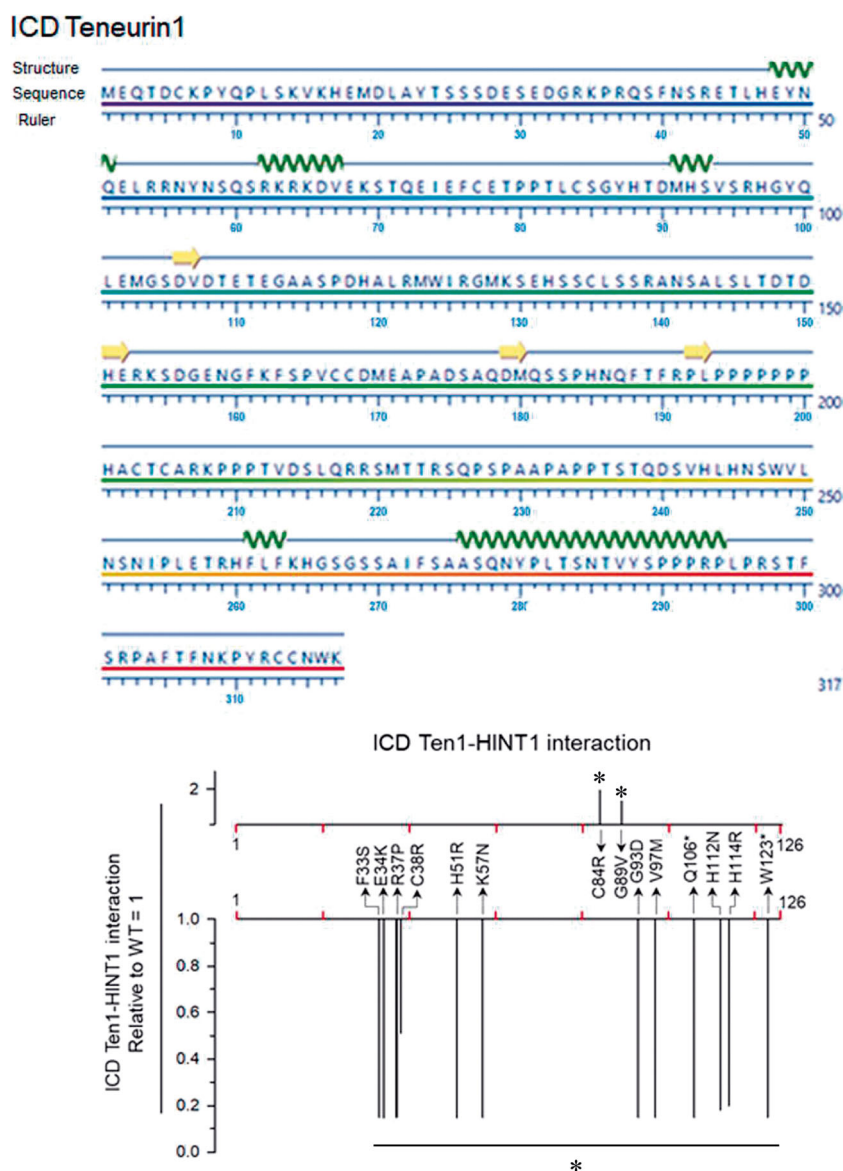
delayed by drugs such as riluzole, which diminishes the function of NMDARs [46].

The association of HINT1 proteins with ICD teneurin 1 and σ 1Rs is relevant to the normal functioning of motor pathways. HINT1 couples with ICD teneurin 1, which acts as a transcription factor in the nucleus [22], and its dysfunction has been associated with Alzheimer's disease [47]. Teneurins (four members in humans, Ten1–4) promote neurite outgrowth, cell adhesion, dendritic morphology, axonal guidance, and synapse formation [48]. The two teneurins present in *Drosophila*, Ten-m, and Ten-a regulate neuromuscular synapse organization and target selection [49]. Ten-a is presynaptic, while Ten-m is mostly postsynaptic; neuronal Ten-a and muscle Ten-m form a complex in vivo. Elevated Ten-m expression regulates target selection in specific moto neurons and muscles via homophilic matching and functions with additional molecules to mediate precise neuromuscular connectivity. Pre- or postsynaptic teneurin perturbations cause severe synapse loss and impair many facets of organization transynaptically and cell-autonomously. In addition, three missense mutations have

been identified in the human *TEN4* gene, which are associated with patient families displaying essential tremor movement disorder [50]. Ten4 is a regulator of oligodendrocyte differentiation and plays a critical role in the myelination of small-diameter axons in the central nervous system [51]. Moreover, Ten4^{-/-} mice exhibit a tremor-like phenotype, and a missense mutation in *TEN1* gene was predicted to be potentially pathogenic for cerebral palsy, a clinically heterogeneous group of disorders affecting movement and posture [52].

On the other hand, like teneurin 1, the HINT1-associated protein RGSZ2 has also been involved in Alzheimer's disease as well as in cognition, panic disorder, schizophrenia [53], and several human cancers, such as lung, prostate, breast, and liver [19, 20]. In vivo regulation of σ 1R and glutamate NMDAR promotes HINT1 binding to sumoylated RGSZ2 proteins [7]. The covalent attachment of SUMO does not affect RGSZ2 binding to GPCR-activated G α GTP subunits but abolishes its GTPase accelerating activity. By contrast, non-covalent binding of SUMO with the SIM located in the RGS box impedes RGSZ2 from interacting with G α GTP subunits.

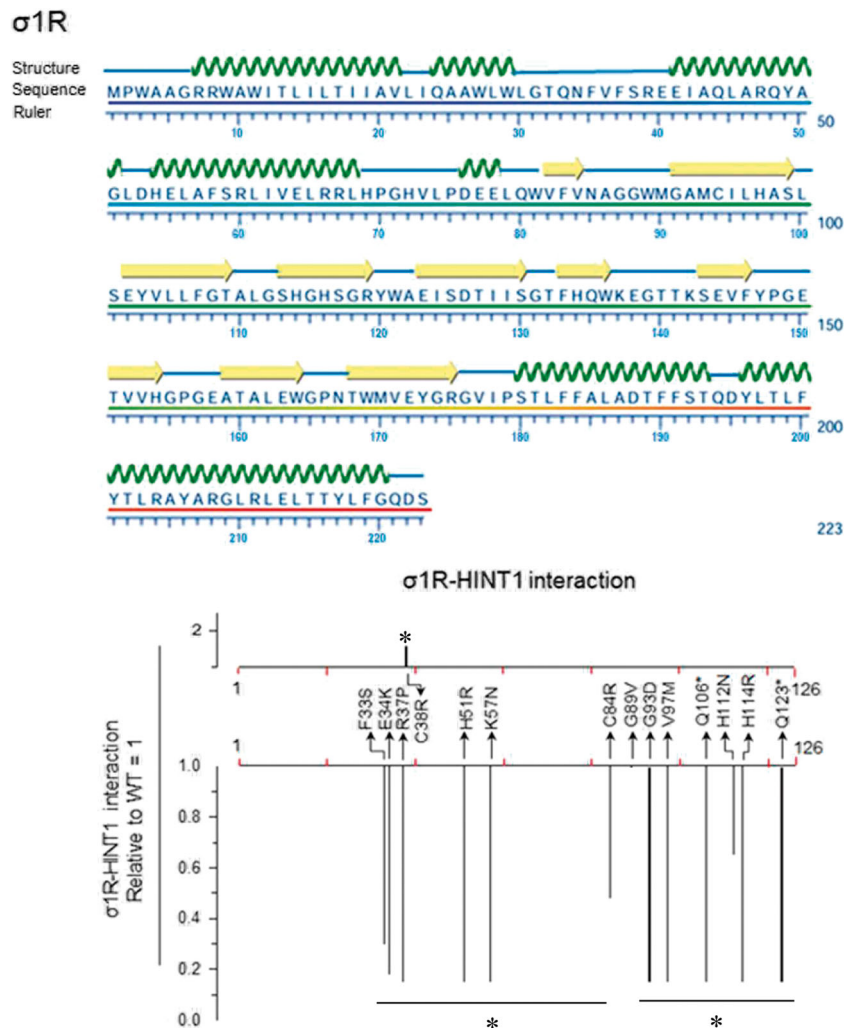
Fig. 5 Altered binding of human HINT1 mutants to ICD teneurin 1. Sequence of ICD teneurin 1 showing the secondary structure and graphical representation of the binding of HINT1 WT and mutants to the ICD region of teneurin 1. Recombinant ICD teneurin 1 (100 nM) covalently attached to agarose was incubated with HINT1 WT and the different human HINT1 mutants (200 nM) in the presence of 2.5 mM CaCl₂ (details as in Fig. 2). Further details of immunoblot detection in Methods and supplemental Fig. 7. ICD, intracellular domain; WT, wild-type



Binding of SUMO to the RGS22 SIM that lies outside the RGS box does not affect G α GTP binding or GTPase accelerating activity (GAP) [53], but it could lead to regulatory interactions with other sumoylated proteins. Thus, RGS22 activity propagating GPCR signaling via activated G proteins is under regulation by SUMO and the HINT1 protein. While almost every mutation in the human HINT1 protein weakened the interactions with associated proteins, the interactions with RGS22 were more evenly altered, with almost half increasing and half decreasing the strength of their binding. Because HINT1 couples with ICD teneurin 1, which acts as a transcription factor in the nucleus [22], disruptions in HINT1-teneurin 1 or HINT1-RGS22 interactions together with the impairment of HINT1 isopeptidase activity may affect the function of these proteins in the nucleus, regulating gene expression, which may underlie the pathophysiology of ARAN-NM.

The σ 1R is a transmembrane protein mostly located in the endoplasmic reticulum (ER) [54] but also at the plasma membrane [55–57] and at the nuclear envelope [58, 59]. Notably, σ 1R is highly expressed in motor neurons [60, 61], and autosomal recessive loss-of-function mutations in σ 1R are primarily associated with distal hereditary motor neuropathy [59, 62, 63] and amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia (ALS/FTD) [64–66]. Indeed, the σ 1R E102Q mutation that causes juvenile ALS [67] eludes ligand control, exhibits anomalous response to calcium, and rapidly aggregates in the ER and associated compartments in transfected cells, provoking alterations in proteasomal degradation and calcium homeostasis [68, 69]. Moreover, the lack of σ 1R exacerbates ALS progression in G93A-SOD1 mice, and σ 1R^{-/-} mice showed motor neuron degeneration pathology [70]. HINT1 does not establish strong interactions with σ 1Rs [18], but both

Fig. 6 Altered binding of human HINT1 mutants to σ 1R. Sequence of σ 1R showing the secondary structure and graphical representation of the binding of HINT1 WT and mutants to this receptor. Recombinant σ 1R (100 nM) covalently attached to agarose was incubated with HINT1 WT and the different human HINT1 mutants (200 nM) in the presence of 2.5 mM CaCl_2 (details as in Fig. 2). Further details of immunoblot detection in Methods and supplemental Fig. 8. σ 1R, type 1 sigma receptor; WT, wild-type



proteins cooperate to bring certain GPCRs under the regulation of glutamate NMDARs [18]. Given the high expression of σ 1Rs in motor neurons and the functional relation between HINT1 and σ 1R, mutations in any of these proteins may impair a series of physiological pathways, provoking the onset of motor neuron pathology.

As mentioned, the targeted deletion of the *HINT1* gene does not promote significant motor disturbances or peripheral neuropathy in mice [11]. This observation indicates that HINT1 functions are efficiently substituted by other proteins. In ARAN-NM patients homozygous for these mutations, HINT1 proteins are rapidly metabolized by the proteasome [8], suggesting that mutated HINT1 proteins challenge cell viability. However, its continued destruction does not prevent cell damage from accumulating until motor disease finally becomes apparent. If this is the case, an early expression block of HINT1 mutants would likely reduce the phenotypic expression of ARAN-NM. Interestingly, recent reports suggest a potential therapeutic role for HINT1 exogenous regulators

in the clinical management of acute and neuropathic pain [71, 72]. The possible utility of such pharmacological interventions to alleviate the progression of HINT1-related ARAN-NM merits consideration.

In summary, HINT1 is highly phylogenetically conserved, suggesting that it is a protein with high biological relevance. Human HINT1 mutations that produce ARAN-NM give rise to abnormal associations with signaling proteins that regulate or are regulated by wild-type HINT1 in neuronal cells. Thus, in the absence of these interactions, mutated HINT1 proteins could accumulate causing cell damage. Therefore, the pathogenesis of this disease may be related to the deterioration of a signaling pathway particularly relevant to motor neurons and in which HINT1 is involved.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02265-x>.

Acknowledgments Elsa Cortés-Montero is a recipient of a Fellowship from MEC [FPU 15/02356]. We would like to thank Gabriela de

Alba and María José López for their excellent technical assistance. We also appreciate the advice of the Department of Statistics, Center for Informatics at the Spanish Council for Scientific Research (CSIC).

Authors' Contributions The JGN, ECM, and MRM designed the research. ECM and JGN wrote the manuscript. JGN and PSB obtained the funding. ECM and MRM performed the experiments and the statistical analysis of data. All authors approved the final manuscript.

Funding This work was supported by Plan Nacional I+D+i [grant number RT-2018-093677-B-100].

Data Availability All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval All procedures were approved by the Spanish government and in accordance with the guidelines of the European Communities Council Directives.

Consent to Participate Not applicable.

Consent for Publication Not applicable.

References

- Brzoska PM, Chen H, Levin NA, Kuo WL, Collins C, Fu KK, Gray JW, Christman MF (1996) Cloning, mapping, and in vivo localization of a human member of the PKCI-1 protein family (PRKCNH1). *Genomics* 36:151–156. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0435>
- Chou TF, Tikh IB, Horta BA, Ghosh B, De Alencastro RB, Wagner CR (2007) Engineered monomeric human histidine triad nucleotide-binding protein 1 hydrolyzes fluorogenic acyl-adenylate and lysyl-tRNA synthetase-generated lysyl-adenylate. *J Biol Chem* 282:15137–15147. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606972200>
- Brenner C (2002) Hint, Fhit, and GalT: function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases. *Biochemistry* 41:9003–9014. <https://doi.org/10.1021/bi025942q>
- Chou TF, Wagner CR (2007) Lysyl-tRNA synthetase-generated lysyl-adenylate is a substrate for histidine triad nucleotide binding proteins. *J Biol Chem* 282:4719–4727. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610530200>
- Rodríguez-Muñoz M, Garzón J (2013) Nitric oxide and zinc-mediated protein assemblies involved in mu opioid receptor signaling. *Mol Neurobiol* 48:769–782. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8465-z>
- Rodríguez-Muñoz M, Torre-Madrid E, Sánchez-Blázquez P, Garzón J (2011) NO-released zinc supports the simultaneous binding of Raf-1 and PKC γ cysteine-rich domains to HINT1 protein at the mu-opioid receptor. *Antioxid Redox Signal* 14:2413–2425. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3511>
- Cortés-Montero E, Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Garzón J (2019) The axonal motor neuropathy-related HINT1 protein is a zinc- and calmodulin-regulated cysteine SUMO protease. *Antioxid Redox Signal* 31:503–520. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7724>
- Zimon M, Baets J, Almeida-Souza L, De VE, Nikodinovic J, Parman Y et al (2012) Loss-of-function mutations in HINT1 cause axonal neuropathy with neuromyotonia. *Nat Genet* 44:1080–1083. <https://doi.org/10.1038/ng.2406>
- Boerkoel CF, Takashima H, Garcia CA, Olney RK, Johnson J, Berry K, Russo P, Kennedy S et al (2002) Charcot-Marie-tooth disease and related neuropathies: mutation distribution and genotype-phenotype correlation. *Ann Neurol* 51:190–201. <https://doi.org/10.1002/ana.10089>
- Peeters K, Chamova T, Tournev I, Jordanova A (2017) Axonal neuropathy with neuromyotonia: there is a HINT. *Brain* 140:868–877. <https://doi.org/10.1093/brain/aww301>
- Seburn KL, Morelli KH, Jordanova A, Burgess RW (2014) Lack of neuropathy-related phenotypes in hint1 knockout mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 73:693–701. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000085>
- Liu Q, Puche AC, Wang JB (2008) Distribution and expression of protein kinase C interactive protein (PKCI/HINT1) in mouse central nervous system (CNS). *Neurochem Res* 33:1263–1276. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9578-4>
- McDonald JR, Groschel-Stewart U, Walsh MP (1987) Properties and distribution of the protein inhibitor (Mr 17,000) of protein kinase C. *Biochem J* 242:695–705. <https://doi.org/10.1042/bj2420695>
- Garzón J, Rodríguez-Muñoz M, Vicente-Sánchez A, Bailón C, Martínez-Murillo R, Sánchez-Blázquez P (2011) RGSZ2 binds to the neural nitric oxide synthase PDZ domain to regulate mu-opioid receptor-mediated potentiation of the N-methyl-D-aspartate receptor-calmodulin-dependent protein kinase II pathway. *Antioxid Redox Signal* 15:873–887. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3767>
- Ajit SK, Ramineni S, Edris W, Hunt RA, Hum WT, Hepler JR, Young KH (2007) RGSZ1 interacts with protein kinase C interacting protein PKCI-1 and modulates mu opioid receptor signaling. *Cell Signal* 19:723–730. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.09.008>
- Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Herrero-Labrador R, Martínez-Murillo R, Merlos M, Vela JM, Garzón J (2015) The sigma1 receptor engages the redox-regulated HINT1 protein to bring opioid analgesia under NMDA receptor negative control. *Antioxid Redox Signal* 22:799–818. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5993>
- Pearson JD, DeWald DB, Mathews WR, Mozier NM, Zurcher-Neeley HA, Heinrichson RL et al (1990) Amino acid sequence and characterization of a protein inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 265:4583–4591
- Rodríguez-Muñoz M, Cortés-Montero E, Pozo-Rodríguez A, Sánchez-Blázquez P, Garzón-Niño J (2015) The ON:OFF switch, sigma1R-HINT1 protein, controls GPCR-NMDA receptor cross-regulation: implications in neurological disorders. *Oncotarget* 6:35458–35477. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6064>
- Bodle CR, Mackie DI, Roman DL (2013) RGS17: an emerging therapeutic target for lung and prostate cancers. *Future Med Chem* 5:995–1007. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.91>
- Hayes MP, Roman DL (2016) Regulator of G protein signaling 17 as a negative modulator of GPCR signaling in multiple human cancers. *AAPS J* 18:550–559. <https://doi.org/10.1208/s12248-016-9894-1>
- Weiske J, Huber O (2005) The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF-beta-catenin-mediated transcription. *J Cell Sci* 118:3117–3129. <https://doi.org/10.1242/jcs.02437>
- Scholer J, Ferralli J, Thiry S, Chiquet-Ehrismann R (2015) The intracellular domain of teneurin-1 induces the activity of

- microphthalmia-associated transcription factor (MITF) by binding to transcriptional repressor HINT1. *J Biol Chem* 290:8154–8165. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.615922>
23. Huebner K, Saldivar JC, Sun J, Shibata H, Druck T (2011) Hits, Fhits and nits: beyond enzymatic function. *Adv Enzym Regul* 51: 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2010.09.003>
 24. Li H, Balajee AS, Su T, Cen B, Hei TK, Weinstein IB (2008) The HINT1 tumor suppressor regulates both gamma-H2AX and ATM in response to DNA damage. *J Cell Biol* 183:253–265. <https://doi.org/10.1083/jcb.200711150>
 25. Weiske J, Huber O (2006) The histidine triad protein Hint1 triggers apoptosis independent of its enzymatic activity. *J Biol Chem* 281: 27356–27366. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513452200>
 26. Li H, Zhang Y, Su T, Santella RM, Weinstein IB (2006) Hint1 is a haplo-insufficient tumor suppressor in mice. *Oncogene* 25:713–721. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209111>
 27. Su T, Suzui M, Wang L, Lin CS, Xing WQ, Weinstein IB (2003) Deletion of histidine triad nucleotide-binding protein 1/PKC-interacting protein in mice enhances cell growth and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7824–7829. <https://doi.org/10.1073/pnas.1332160100>
 28. Zhang YJ, Li H, Wu HC, Shen J, Wang L, Yu MW, Lee PH, Bernard Weinstein I et al (2009) Silencing of Hint1, a novel tumor suppressor gene, by promoter hypermethylation in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 275:277–284. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.10.042>
 29. Rodríguez-Muñoz M, Bermudez D, Sánchez-Blázquez P, Garzón J (2007) Sumoylated RGS-Rz proteins act as scaffolds for Mu-opioid receptors and G-protein complexes in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* 32:842–850. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301184>
 30. Eifler K, Vertegeal AC (2015) Mapping the SUMOylated landscape. *FEBS J* 282:3669–3680. <https://doi.org/10.1111/febs.13378>
 31. Lima CD, Klein MG, Weinstein IB, Hendrickson WA (1996) Three-dimensional structure of human protein kinase C interacting protein 1, a member of the HIT family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5357–5362. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5357>
 32. Shah RM, Maize KM, West HT, Strom AM, Finzel BC, Wagner CR (2018) Structure and functional characterization of human histidine triad nucleotide-binding protein 1 mutations associated with inherited axonal neuropathy with neuromyotonia. *J Mol Biol* 430: 2709–2721. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.05.028>
 33. Yap KL, Kim J, Truong K, Sherman M, Yuan T, Ikura M (2000) Calmodulin target database. *J Struct Funct Genomics* 1:8–14. 10.1023/a: 1011320027914
 34. Zhao Q, Xie Y, Zheng Y, Jiang S, Liu W, Mu W, Liu Z, Zhao Y et al (2014) GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic Acids Res* 42:W325–W330. <https://doi.org/10.1093/nar/gku383>
 35. Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Vicente-Sánchez A, Bailón C, Martín-Aznar B, Garzón J (2011) The histidine triad nucleotide-binding protein 1 supports mu-opioid receptor-glutamate NMDA receptor cross-regulation. *Cell Mol Life Sci* 68: 2933–2949. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0598-x>
 36. Cen B, Li H, Weinstein IB (2009) Histidine triad nucleotide-binding protein 1 up-regulates cellular levels of p27KIP1 by targeting ScfSKP2 ubiquitin ligase and Src. *J Biol Chem* 284: 5265–5276. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804531200>
 37. Wang L, Li H, Zhang Y, Santella RM, Weinstein IB (2009) HINT1 inhibits beta-catenin/TCF4, USF2 and NFkappaB activity in human hepatoma cells. *Int J Cancer* 124:1526–1534. <https://doi.org/10.1002/ijc.24072>
 38. Lee YN, Nechushtan H, Figov N, Razin E (2004) The function of lysyl-tRNA synthetase and Ap4A as signaling regulators of MITF activity in FcepsilonRI-activated mast cells. *Immunity* 20:145–151. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(04\)00020-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(04)00020-2)
 39. Lee YN, Razin E (2005) Nonconventional involvement of LysRS in the molecular mechanism of USF2 transcriptional activity in FcepsilonRI-activated mast cells. *Mol Cell Biol* 25:8904–8912. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.20.8904-8912.2005>
 40. Kumar V, Chichili VP, Tang X, Sivaraman J (2013) A novel trans conformation of ligand-free calmodulin. *PLoS One* 8:e54834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054834>
 41. Warren JT, Guo Q, Tang WJ (2007) A 1.3-Å structure of zinc-bound N-terminal domain of calmodulin elucidates potential early ion-binding step. *J Mol Biol* 374:517–527. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.09.048>
 42. Guang W, Wang H, Su T, Weinstein IB, Wang JB (2004) Role of mPKC ϵ , a novel mu-opioid receptor interactive protein, in receptor desensitization, phosphorylation, and morphine-induced analgesia. *Mol Pharmacol* 66:1285–1292. <https://doi.org/10.1124/mol.66.5>
 43. Rodríguez-Muñoz M, Torre-Madrid E, Sánchez-Blázquez P, Wang JB, Garzón J (2008) NMDAR-nNOS generated zinc recruits PKC γ to the HINT1-RGS17 complex bound to the C terminus of Mu-opioid receptors. *Cell Signal* 20:1855–1864. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.06.015>
 44. Ehlers MD, Zhang S, Bernhardt JP, Huganir RL (1996) Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* 84:745–755. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81052-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81052-1)
 45. Lipton SA (2006) Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 5:160–170. <https://doi.org/10.1038/nrd1958>
 46. Lu H, Le WD, Xie YY, Wang XP (2016) Current therapy of drugs in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Neuropharmacol* 14:314–321. <https://doi.org/10.2174/1570159x14666160120152423>
 47. Bastias-Candia S, Braidy N, Zolezzi JM, Inestrosa NC (2015) Teneurins and Alzheimer's disease: a suggestive role for a unique family of proteins. *Med Hypotheses* 84:402–407. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2015.01.026>
 48. Leamey CA, Sawatari A (2019) Teneurins: mediators of complex neural circuit assembly in mammals. *Front Neurosci* 13:580. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00580>
 49. Mosca TJ, Hong W, Dani VS, Favalaro V, Luo L (2012) Trans-synaptic Teneurin signalling in neuromuscular synapse organization and target choice. *Nature* 484:237–241. <https://doi.org/10.1038/nature10923>
 50. Hor H, Francescato L, Bartesaghi L, Ortega-Cubero S, Kousi M, Lorenzo-Betancor O, Jiménez-Jiménez FJ, Gironell A et al (2015) Missense mutations in TENM4, a regulator of axon guidance and central myelination, cause essential tremor. *Hum Mol Genet* 24: 5677–5686. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv281>
 51. Suzuki N, Fukushi M, Kosaki K, Doyle AD, de Vega S, Yoshizaki K et al (2012) Teneurin-4 is a novel regulator of oligodendrocyte differentiation and myelination of small-diameter axons in the CNS. *J Neurosci* 32:11586–11599. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2045-11.2012>
 52. McMichael G, Bainbridge MN, Haan E, Corbett M, Gardner A, Thompson S, van Bon BWM, van Eyk CL et al (2015) Whole-exome sequencing points to considerable genetic heterogeneity of cerebral palsy. *Mol Psychiatry* 20:176–182. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.189>
 53. Garzón J, Rodríguez-Muñoz M, Vicente-Sánchez A, García-López MA, Martínez-Murillo R, Fischer T, Sánchez-Blázquez P (2011) SUMO-SIM interactions regulate the activity of RGS22 proteins. *PLoS One* 6:e28557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028557>
 54. Hayashi T, Su TP (2003) Sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export. *J Pharmacol Exp Ther* 306:718–725. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.051284>

55. Sánchez-Blázquez P, Rodríguez-Muñoz M, Herrero-Labrador R, Burgueño J, Zamanillo D, Garzón J (2014) The calcium-sensitive Sigma-1 receptor prevents cannabinoids from provoking glutamate NMDA receptor hypofunction: implications in antinociception and psychotic diseases. *Int J Neuropsychopharmacol* 17:1943–1955. <https://doi.org/10.1017/S1461145714000029>
56. Kim FJ, Kovalyshyn I, Burgman M, Neilan C, Chien CC, Pasternak GW (2010) Sigma 1 receptor modulation of G-protein-coupled receptor signaling: potentiation of opioid transduction independent from receptor binding. *Mol Pharmacol* 77:695–703. <https://doi.org/10.1124/mol.109.057083>
57. Navarro G, Moreno E, Aymerich M, Marcellino D, McCormick PJ, Mallo J et al (2010) Direct involvement of sigma-1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:18676–18681. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008911107>
58. Pal A, Fontanilla D, Gopalakrishnan A, Chae YK, Markley JL, Ruoho AE (2012) The sigma-1 receptor protects against cellular oxidative stress and activates antioxidant response elements. *Eur J Pharmacol* 682:12–20. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.01.030>
59. Tsai SY, Chuang JY, Tsai MS, Wang XF, Xi ZX, Hung JJ et al (2015) Sigma-1 receptor mediates cocaine-induced transcriptional regulation by recruiting chromatin-remodeling factors at the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E6562–E6570. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518894112>
60. Mavlyutov TA, Epstein ML, Andersen KA, Ziskind-Conhaim L, Ruoho AE (2010) The sigma-1 receptor is enriched in postsynaptic sites of C-terminals in mouse motoneurons. An anatomical and behavioral study. *Neuroscience* 167:247–255. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.022>
61. Gundlach AL, Largent BL, Snyder SH (1986) Autoradiographic localization of sigma receptor binding sites in Guinea pig and rat central nervous system with (+)3H-3-(3-hydroxyphenyl)-N-(1-propyl)piperidine. *J Neurosci* 6:1757–1770
62. Gregianin E, Pallafacchina G, Zanin S, Crippa V, Rusmini P, Poletti A, Fang M, Li Z et al (2016) Loss-of-function mutations in the SIGMAR1 gene cause distal hereditary motor neuropathy by impairing ER-mitochondria tethering and Ca²⁺ signalling. *Hum Mol Genet* 25:3741–3753. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw220>
63. Almendra L, Laranjeira F, Fernandez-Marmiesse A, Negro L (2018) SIGMAR1 gene mutation causing distal hereditary motor neuropathy in a Portuguese family. *Acta Myol* 37:2–4
64. Luty AA, Kwok JB, Dobson-Stone C, Loy CT, Coupland KG, Karlstrom H et al (2010) Sigma nonopioid intracellular receptor 1 mutations cause frontotemporal lobar degeneration-motor neuron disease. *Ann Neurol* 68:639–649. <https://doi.org/10.1002/ana.22274>
65. Ullah MI, Ahmad A, Raza SI, Amar A, Ali A, Bhatti A, John P, Mohyuddin A et al (2015) In silico analysis of SIGMAR1 variant (rs4879809) segregating in a consanguineous Pakistani family showing amyotrophic lateral sclerosis without frontotemporal lobar dementia. *Neurogenetics* 16:299–306. <https://doi.org/10.1007/s10048-015-0453-1>
66. Watanabe S, Ilieva H, Tamada H, Nomura H, Komine O, Endo F et al. (2016) Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in SIG. *EMBO Mol Med* 8:1421–1437. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606403>
67. Al-Saif A, Al-Mohanna F, Bohlega S (2011) A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 70:913–919. <https://doi.org/10.1002/ana.22534>
68. Rodríguez-Muñoz M, Cortés-Montero E, Garzón-Niño J, Sánchez-Blázquez P (2020) The ALS-related sigma1R E102Q mutant eludes ligand control and exhibits anomalous response to calcium. *Int J Mol Sci* 21 <https://doi.org/10.3390/ijms21197339>
69. Dreser A, Vollrath JT, Sechi A, Johann S, Roos A, Yamoah A, Katona I, Bohlega S et al (2017) The ALS-linked E102Q mutation in sigma receptor-1 leads to ER stress-mediated defects in protein homeostasis and dysregulation of RNA-binding proteins. *Cell Death Differ* 24:1655–1671. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.88>
70. Bernard-Marissal N, Medard JJ, Azzedine H, Chrast R (2015) Dysfunction in endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk underlies SIGMAR1 loss of function mediated motor neuron degeneration. *Brain* 138:875–890. <https://doi.org/10.1093/brain/awv008>
71. Shah RM, Peterson C, Strom A, Dillenburg M, Finzel B, Kitto KF, Fairbanks C, Wilcox G et al (2019) Inhibition of HINT1 modulates spinal nociception and NMDA evoked behavior in mice. *ACS Chem Neurosci* 10:4385–4393. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.9b00432>
72. Garzón J, Herrero-Labrador R, Rodríguez-Muñoz M, Shah R, Vicente-Sánchez A, Wagner CR, Sánchez-Blázquez P (2015) HINT1 protein: a new therapeutic target to enhance opioid antinociception and block mechanical allodynia. *Neuropharmacology* 89:412–423. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.10.022>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

