

MECANISMO DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE LA TRIMETILLISINA MEDIANTE PROTEÍNAS LECTORAS EPIGENÉTICAS**MECHANISM OF BIOMOLECULAR RECOGNITION OF TRIMETHYLlysINE BY EPIGENETIC READER PROTEINS***Jordi Poater**Departament de Química Inorgànica i Orgànica & IQTCUB, Universitat de Barcelona*

La comprensión del reconocimiento biomolecular de proteínas histonas modificadas postraduccionalmente es de vital importancia para la hipótesis del código de histonas. A pesar de los extensos estudios estructurales y de unión sobre la lectura de histonas, el lenguaje molecular mediante el cual se leen las modificaciones postraducionales en las proteínas histonas sigue siendo poco conocido. Aquí presentamos estudios de química físico-orgánica sobre el reconocimiento de la trimetilisina cargada positivamente por un sistema aromático rico en electrones. El carácter aromático de dos residuos de triptófano que constituyen únicamente el sistema aromático de KDM5A se modificó mediante la incorporación de sustituyentes de flúor. Este trabajo demuestra que el reconocimiento biomolecular de trimetilisina mediante distintos sistemas aromáticos está asociado con interacciones catión- π más débiles que son compensadas por la liberación mediada por trimetilisina energéticamente más favorable de moléculas de agua.

Por otro lado, buscamos establecer si la trimetilialisina, un análogo de la trimetilisina generado a través de la alquilación de cisteína, es un buen mimico de la trimetilisina para estudios sobre reconocimiento molecular por proteínas lectoras. Ambos péptidos de histona que contienen trimetilialisina y trimetilisina se han examinado para determinar su unión con cinco proteínas lectoras humanas empleando una combinación de análisis termodinámicos, simulaciones de dinámica molecular y análisis químico-cuánticos.

Colectivamente, nuestros hallazgos experimentales y computacionales revelan que la trimetilialisina y la trimetilisina exhiben características de unión muy similares para la asociación con proteínas lectoras humanas, lo que justifica el uso de trimetilialisina para estudios dirigidos a diseccionar el origen del reconocimiento biomolecular en procesos epigenéticos que desempeñan papeles importantes en humanos.

The understanding of biomolecular recognition of posttranslationally modified histone proteins is centrally important to the histone code hypothesis. Despite extensive binding and structural studies on the readout of histones, the molecular language by which posttranslational modifications on histone proteins are read remains poorly understood. Here

we report physical-organic chemistry studies on the recognition of the positively charged trimethyllysine by the electron-rich aromatic cage containing PHD3 finger of KDM5A. The aromatic character of two tryptophan residues that solely constitute the aromatic cage of KDM5A was fine-tuned by the incorporation of fluorine substituents. Our thermodynamic analyses reveal that the wild-type and fluorinated KDM5A PHD3 fingers associate equally well with trimethyllysine. This work demonstrates that the biomolecular recognition of trimethyllysine by fluorinated aromatic cages is associated with weaker cation- π interactions that are compensated by the energetically more favourable trimethyllysine-mediated release of high-energy water molecules that occupy the aromatic cage.

On the other hand, we seek to establish whether trimethylthylisine, an analog of trimethyllysine generated through the alkylation of cysteine, is a good mimic of trimethyllysine for studies on molecular recognition by reader proteins. Both histone peptides that contain trimethylthylisine and trimethyllysine have been screened for binding to five human reader proteins using a combination of thermodynamic analysis, molecular dynamics simulations, and quantum-chemical analysis.

Collectively, our experimental and computational findings reveal that trimethylthylisine and trimethyllysine exhibit very similar binding characteristics for association with human reading proteins, which justifies the use of trimethyllysine for studies aimed at dissecting the origin of biomolecular recognition in epigenetic processes that perform important roles in humans.

INTERACCIONES NEUROINMUNITARIAS EN EL DOLOR NEUROPÁTICO: MODULACIÓN POR LOS RECEPTORES SIGMA-1**NEUROIMMUNE INTERACTIONS IN NEUROPATHIC PAIN: MODULATION BY SIGMA-1 RECEPTORS***Enrique J. Cobos del Moral**Departamento de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica e Instituto de Neurociencias, Universidad Granada e Instituto de Investigación Biosanitaria ibs. GRANADA*

Las células inmunitarias y gliales juegan un papel muy relevante en el dolor crónico. Nuestro grupo de investigación (y por supuesto otros muchos) ha dedicado parte de su actividad al estudio de las interacciones entre neuronas y otros tipos de células en la generación del dolor crónico, y en particular del dolor neuropático. Cuando se produce un daño en un nervio, los somas de las neuronas sensoriales periféricas, localizados en los ganglios de las raíces dorsales (DRG, de sus siglas en inglés), emiten señales químicas que impulsan

la atracción de las células inmunitarias. Entre estas señales químicas destaca la quimioquina CCL-2, la cual es importante para el reclutamiento de los macrófagos al DRG. El daño nervioso no sólo produce la activación del sistema inmunitario innato, sino también la del sistema inmunitario adaptativo, puesto que reclutan células T a los DRG afectados. Esto, en su conjunto, produce un ambiente proinflamatorio muy acusado. Hemos demostrado que el desarrollo de alodinia mecánica en el ratón ocurre en paralelo a la expresión de marcadores inmunitarios en el DRG (determinados por microarrays), y de hecho, la eliminación de macrófagos o de células T produce una disminución considerable de la alodinia neuropática. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de las células inmunitarias en el desarrollo del dolor neuropático.

Por otro lado, el receptor sigma-1 es una proteína chaperona, la cual, tras su activación por el incremento del Ca^{2+} intracelular, migra desde localizaciones intracelulares a zonas cercanas a la membrana plasmática, donde modula un amplio abanico de receptores y canales iónicos neuronales. El papel del receptor sigma-1 en el dolor crónico ha sido estudiado en las últimas décadas. De hecho, en la actualidad hay un antagonista sigma-1 en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento del dolor (a cuyo desarrollo hemos contribuido), aunque sus mecanismos de acción analgésica no han sido totalmente dilucidados. Hemos demostrado recientemente que este receptor sigma-1 se localiza en todas las neuronas sensoriales periféricas, y que tras el daño nervioso se externaliza (lo cual indica su activación) especialmente en las neuronas lesionadas (ATF3+). Mediante el estudio del transcriptoma del DRG de ratones mutantes deficientes para el receptor sigma-1 (knockout sigma-1) tras el daño nervioso, determinamos que la inhibición de este receptor producía una disminución notable en transcritos indicativos de células inmunitarias (como macrófagos) y de diversas quimioquinas (como CCL-2) y de factores proinflamatorios. De hecho, los ratones knockout sigma-1 mostraron unos niveles marcadamente reducidos de macrófagos en el DRG tras el daño nervioso, así como una reducción de citoquinas proinflamatorias y de la alodinia neuropática.

Nuestros hallazgos indican que el receptor sigma-1 periférico juega un papel muy relevante en la interacción neuroinmunitaria en el DRG tras la lesión de un nervio periférico, y por lo tanto en los mecanismos fisiopatológicos del dolor neuropático, lo cual podría tener utilidad clínica.

Agradecimientos: Agencia Estatal de Investigación (10.13039/501100011033 - SAF2016-80540R y PID2019-108691RB-I00), Junta de Andalucía (grupo CTS-109 y proyecto P20.00132) y fondos FEDER.

Immune and glial cells play a very important role in chronic pain. Our research group (and of course

many others) has dedicated part of its activity to the study of the interactions between neurons and other cell types in the generation of chronic pain, and in particular neuropathic pain. When nerve damage occurs, the soma of peripheral sensory neurons, located in the dorsal root ganglia (DRG), release chemical signals that attract immune cells. Among these chemical signals, it is worth highlighting the chemokine CCL-2, as it is important for the recruitment of macrophages to the DRG. Nerve damage not only induces the activation of the innate immune system, but also the activity of the adaptive immune system, since there is a recruitment of T cells to the affected DRGs. This process, as a whole, results in a pronounced pro-inflammatory environment. We have shown that the development of mechanical allodynia in the mouse parallels with the expression of immune markers in the DRG (determined by microarrays), and in fact, depletion of macrophages or T cells produces a considerable decrease in neuropathic allodynia. These results highlight the importance of immune cells in the development of neuropathic pain.

On the other hand, the sigma-1 receptor is a chaperone protein, which, after its activation by the increase in intracellular Ca^{2+} , translocates from intracellular locations to areas close to the plasma membrane, where it modulates a wide variety of receptors and neuronal ion channels. The role of the sigma-1 receptor in chronic pain has been studied in the past decades. In fact, there is currently a sigma-1 antagonist in phase II clinical trials for pain treatment (and we have contributed to its preclinical development), although the mechanisms for its analgesic actions have not been fully elucidated. We have recently shown that this sigma-1 receptor is located in all peripheral sensory neurons, and that after nerve damage it is externalized (denoting its activation), especially in injured neurons (ATF3+). By studying the transcriptome of the DRG from mutant mice deficient for the sigma-1 receptor (sigma-1 knockout mice) after nerve damage, we found that sigma-1 receptor inhibition produced a marked decrease in transcripts from immune cells (such as macrophages) and of several chemokines (such as CCL-2) and pro-inflammatory factors. In fact, sigma-1 knockout mice showed markedly reduced levels of macrophages in the DRG after nerve injury, as well as a reduction in pro-inflammatory cytokines and neuropathic allodynia.

Our findings indicate that the peripheral sigma-1 receptor plays a very relevant role in the neuroimmune interactions in the DRG after peripheral nerve injury, and therefore in the pathophysiological mechanisms of neuropathic pain. These results might have a future clinical utility.

Acknowledgments: Spanish State Research Agency (10.13039/501100011033 - SAF2016-80540R and PID2019-108691RB-I00), Junta de Andalucía (group CTS-109 and grant P20.00132) and ERDF funds.

RECEPTORES σ_1 Y MODULACIÓN DEL DOLOR: UN "PUENTE" ENTRE EL RECEPTOR OPIOIDE μ Y EL TRPV1

σ_1 RECEPTORS AND PAIN MODULATION: A "BRIDGE" BETWEEN THE μ -OPIOID RECEPTOR AND TRPV1

M. Carmen Ruiz-Cantero¹, Elsa Cortés-Montero², Aakanksha Jain³, Angeles Montilla-García¹, Inmaculada Bravo-Caparrós¹, Jaehoon Shim³, Pilar Sánchez-Blázquez², Clifford J. Woolf³, José M. Baeyens¹, Enrique J. Cobos^{1,4}

¹ Department of Pharmacology, Biomedical Research Center and Neurosciences Institute, University of Granada and Biosanitary Research Institute ibs.GRANADA, España.

² Departamento de Neurociencia Traslacional, Neurofarmacología, Instituto Cajal, CSIC, Madrid, España.

³ Departamento de Neurobiología, Harvard Medical School, F.M. Kirby Neurobiology Center, Boston Children's Hospital, Boston, Estados Unidos.

⁴ Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.

Los alógenos químicos producidos durante el dolor patológico sensibilizan las neuronas sensoriales periféricas favoreciendo el desarrollo de la hiperalgesia. Mientras que la prostaglandina E2 (PGE2) y el factor de crecimiento nervioso (NGF) sensibilizan los nociceptores C peptidérgicos (TRPV1+), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) sensibiliza los C no peptidérgicos (IB4+). El receptor sigma-1 es una chaperona sensible al Ca^{2+} presente en las neuronas sensoriales periféricas, el cual se une a TRPV1 y a los receptores opioides μ (MOR), aunque la repercusión funcional de estas interacciones es desconocida. En este trabajo mostramos que la administración de los antagonistas sigma-1 S1RA y BD-1063, en ratones, revirtió la hiperalgesia mecánica inducida

por PGE2 y NGF, pero no la hipersensibilidad mecánica inducida por GDNF. El efecto antihiperalgésico del antagonismo sigma-1 fue abolido por el agonista sigma-1 PRE-084, así como por el antagonista opioide periférico naloxona metiodida y el antagonista selectivo MOR ciprodime, pero no por el antagonista κ nor-binaltorpimina ni por el antagonista δ naltrindol. Estos resultados indican que el efecto antihiperalgésico de los antagonistas sigma-1 es mediado por la activación MOR periférica. Mediante ensayos inmunohistoquímicos, determinamos la presencia del agonista endógeno MOR endomorfin-2 (END2) en los nociceptores TRPV1+ pero no en los nociceptores IB4+. Dicha presencia fue confirmada usando el bisturi molecular resiniferatoxina, que eliminó selectivamente las neuronas TRPV1+ y con ello el marcaje de END2. Además, la administración de un anticuerpo frente a END2 en la pata sensibilizada revirtió el efecto antihiperalgésico inducido por los antagonistas sigma-1, indicando que la acción de este opioide endógeno es esencial para el efecto antihiperalgésico de los antagonistas sigma-1. Usando proteínas recombinantes, mostramos que el antagonista sigma-1 S1RA disocia al receptor sigma-1 del extremo C-terminal del TRPV1 e incrementa su unión al extremo C-terminal de MOR. En otras palabras, el antagonismo sigma-1 mueve a los receptores sigma-1 desde el TRPV1 a MOR como parte de su mecanismo de modulación opioide. Por lo tanto, el receptor sigma-1 podría participar en la comunicación entre TRPV1 y MOR. En cultivos de neuronas de la raíz dorsal (DRG, por sus siglas en inglés), PGE2 incrementó el flujo de calcio inducido por capsaicina, el agonista prototipo TRPV1. Este incremento en el flujo de calcio fue revertido por S1RA de una manera sensible al antagonista opioide naloxona, lo que concuerda con los efectos dependientes de la activación opioide del antagonismo sigma-1 observados *in vivo*. En resumen, nuestros resultados sugieren que el antagonismo

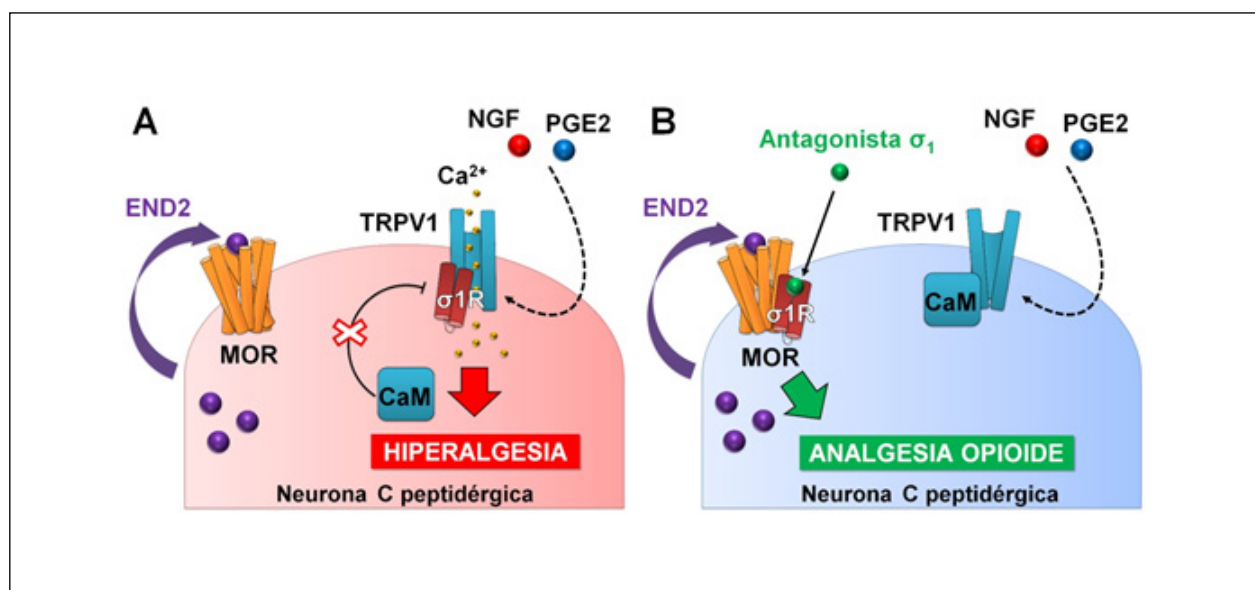


Figura 1. Hipótesis del mecanismo de acción del antagonismo del receptor sigma-1 en la hiperalgesia inducida por la sensibilización de las neuronas C peptidérgicas

sigma-1 disminuye la sensibilización periférica mediante el incremento del tono opioide endógeno en las neuronas C peptidérgicas, que producen END2, mientras que no altera la sensibilización de los nociceptores C no peptidérgicos. Nuestros hallazgos se resumen en la Figura 1.

Agradecimientos: Agencia Estatal de Investigación (10.13039/501100011033 - SAF2016-80540R y FPU16/03213), Universidad de Granada (PPJIB2019.11), Junta de Andalucía (grupo CTS 109) y fondos FEDER.

The algogenic chemicals produced during pathological pain sensitize peripheral sensory neurons, favoring the development of hyperalgesia. While prostaglandin E2 (PGE2) and nerve growth factor (NGF) sensitize peptidergic C-nociceptors (TRPV1+), glial-derived neurotrophic factor (GDNF) sensitizes non-peptidergic C (IB4+) neurons. The sigma-1 receptor is a Ca²⁺-sensitive chaperone present in peripheral sensory neurons, which binds to TRPV1 and μ-opioid receptors (MOR). However, the functional impact of these interactions is unknown. In our present research, we show that the administration of the sigma-1 antagonists S1RA and BD-1063, in mice, reversed mechanical hyperalgesia induced by PGE2 and NGF, but not mechanical hypersensitivity induced by GDNF. The antihyperalgesic effect induced by sigma-1 antagonism was abolished by the sigma-1 agonist PRE-084, as well as by both the peripheral opioid antagonist naloxone methiodide and the selective MOR antagonist cyprodime, but not by the κ antagonist nor-binaltorpimine or by the δ antagonist naltrindole. These results indicate that the antihyperalgesic effect of sigma-1 antagonists is mediated by peripheral MOR activation. Using immunohistochemical assays, we determined

the presence of the endogenous MOR agonist endomorphin-2 (END2) in TRPV1+ nociceptors, but not in IB4+ nociceptors. Using resiniferatoxin, a molecular scalpel, we selectively ablated both TRPV1+ neurons and END2 labeling, confirming the presence of this opioid peptide on peptidergic C-nociceptors. The administration of an antibody against END2 in the sensitized paw reversed the antihyperalgesic effect induced by sigma-1 antagonists, indicating that the action of this endogenous opioid peptide is essential for the antihyperalgesic effect of sigma-1 antagonists. Using recombinant proteins, we show that the sigma-1 antagonist S1RA dissociates the sigma-1 receptor from the C-terminus of TRPV1 and increases its binding to the C-terminus of MOR. In other words, sigma-1 antagonism moves sigma-1 receptors from TRPV1 to MOR as part of its mechanism for opioid modulation. Therefore, the sigma-1 receptor could participate in the communication between TRPV1 and MOR. We show that PGE2 increased calcium flux induced by capsaicin, the prototype TRPV1 agonist, in cultured dorsal root ganglia neurons (DRGs). This increase in calcium flux was reversed by S1RA, and in a naloxone-sensitive manner. These results are consistent with the *in vivo* effects induced by sigma-1 antagonism, which are dependent on opioid activation. In summary, our results suggest that sigma-1 antagonism decreases peripheral sensitization by the increase of the endogenous opioid tone in peptidergic C-neurons, which produce END2, while it does not alter sensitization of non-peptidergic C-nociceptors. Our findings are summarized in Figure 1.

Acknowledgments: Spanish State Research Agency (10.13039 / 501100011033 - SAF2016-80540R and FPU16 / 03213), University of Granada (PPJIB2019.11), Junta de Andalucía (CTS 109 group) and ERDF funds.

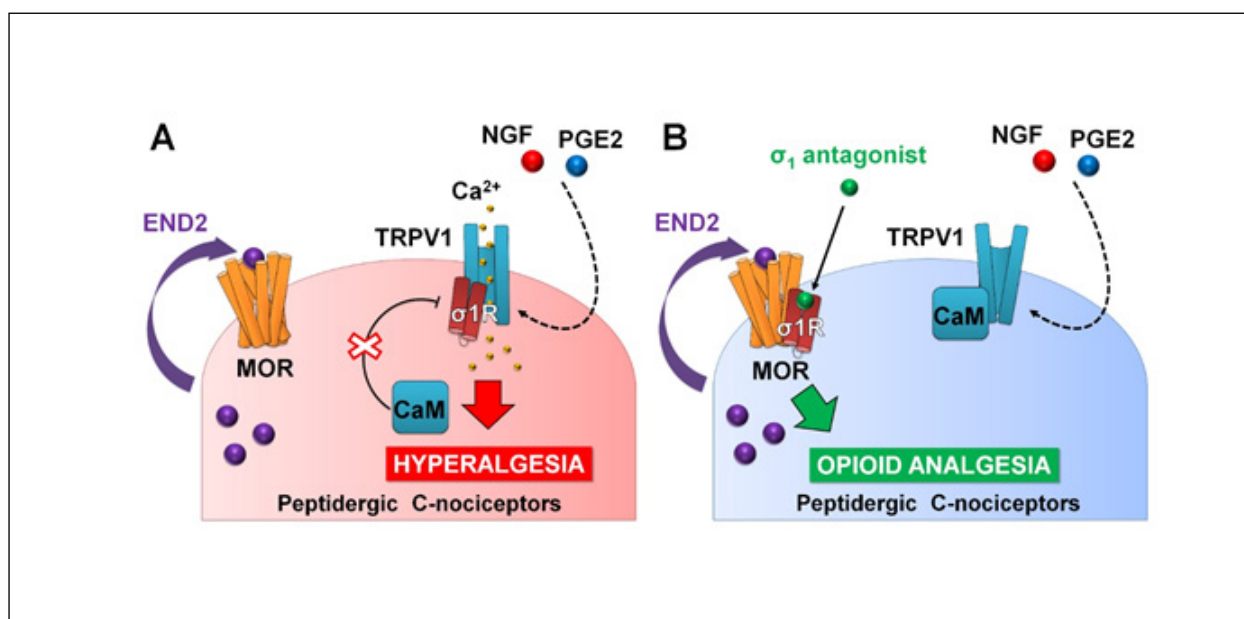


Figure 1. Hypothesis of the mechanism of action of sigma-1 receptor antagonism in the hyperalgesia induced by peptidergic C-neuron sensitization.

LA LAPAROTOMÍA EN EL RATÓN: UN MODELO DE DOLOR POSTOPERATORIO TRASLACIONAL**LAPAROTOMY IN THE MOUSE: A MODEL OF TRANSLATIONAL POSTOPERATIVE PAIN***Miriam Santos-Caballero, Miguel Ángel Huerta, Makeya Abduljabbar Hasoun, M Carmen Ruiz-Cantero, Rafael González-Cano, Enrique J Cobos**Departamento de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica e Instituto de Neurociencias, Universidad Granada, e Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA*

Más de la mitad de los pacientes que se someten a cirugía experimentan dolor moderado o intenso en el periodo postoperatorio inmediato, a pesar del tratamiento analgésico. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento del dolor postoperatorio. La laparotomía es el paso inicial para muchas cirugías abdominales, los cuales son los tipos de cirugía más frecuentes. Por lo tanto, sería interesante caracterizar el dolor inducido por una laparotomía en animales de experimentación, y así facilitar en el futuro el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas para su tratamiento. El dolor postquirúrgico puede clasificarse en tres tipos: dolor en reposo, dolor inducido por el movimiento, y la hipersensibilidad sensorial que se extiende a áreas cercanas a la herida quirúrgica. De estos, sólo la hipersensibilidad sensorial se evalúa rutinariamente en animales de experimentación. Nuestro objetivo fue caracterizar las tres facetas del dolor inducido por la laparotomía en el ratón. La laparotomía consistió en una incisión de 1,5 cm a lo largo de la línea alba hasta alcanzar la cavidad abdominal. Usamos una sutura discontinua para cerrar la musculatura abdominal y el peritoneo, y un punto de colchono horizontal para cerrar la piel. Valoramos la hipersensibilidad cutánea mediante el umbral de von Frey, el dolor en reposo mediante el análisis de las expresiones faciales de los ratones usando un algoritmo de inteligencia artificial basado en una red neuronal convolucional, y el dolor inducido por el movimiento mediante el análisis de la actividad exploratoria de los animales usando un actímetro de infrarrojos. El umbral sensorial abdominal disminuyó desde 1,7g hasta 0,06g a las 4h tras la laparotomía. Este umbral se mantuvo hasta el día 3, y fue restableciéndose paulatinamente hasta normalizarse completamente el día 10 tras la cirugía. Nuestro algoritmo de inteligencia artificial detectó un 13,89% de fotogramas en los que los animales laparotomizados mostraban caras de dolor en registros en video obtenidos a las 4h tras la cirugía, mientras que este valor fue de sólo un 3,34% en el grupo control. Además, la laparotomía indujo una disminución prominente de la actividad exploratoria de los animales (76,01 vs 41,94m en 15 minutos de evaluación). La administración subcutánea de ibuprofeno (64 mg/kg), revirtió casi completamente la hipersensibilidad cutánea (76,77%; $p < 0,01$) y el dolor en reposo (73,65%; $p < 0,05$). Sin embargo, el dolor inducido por el movimiento fue resistente al efecto del ibuprofeno,

de manera que este fármaco fue capaz de revertir sólo un 59,37% de la disminución en la actividad exploratoria inducida por el proceso quirúrgico. Por lo tanto, consideramos que la laparotomía en el ratón es un buen modelo para el estudio de las distintas facetas del dolor postoperatorio (hipersensibilidad sensorial, dolor en reposo y dolor en movimiento), y es adecuada para la valoración de fármacos analgésicos.

Agradecimientos: Agencia Estatal de Investigación (10.13039/501100011033 - PID2019-108691RB-I00, FPU16/03213 y PRE2020-096203), Junta de Andalucía (grupo CTS-109) y fondos FEDER.

More than half of the patients who undergo surgery experience moderate or severe pain in the immediate postoperative period, despite analgesic treatment. Therefore, the development of new strategies for the treatment of postoperative pain are needed. Laparotomy is the initial step for many abdominal surgeries, which are the most common types of surgery. Therefore, it would be interesting to characterize laparotomy induced-pain in experimental animals, to facilitate the future development of new pharmacological strategies for its treatment. Post-surgical pain can be classified into three types: pain at rest, pain induced by movement, and the sensory hypersensitivity that develops to areas close to the surgical wound. Among these three types of pain, only sensory hypersensitivity is routinely evaluated in experimental animals. Our goal was to characterize these three facets of laparotomy-induced pain in the mouse. Laparotomy consisted of a 1.5 cm incision along the linea alba to gain access to the abdominal cavity. We use a discontinuous suture to close the abdominal muscles and peritoneum, and a horizontal mattress stitch to close the skin. We assessed skin hypersensitivity using the von Frey threshold, pain at rest by analyzing the facial expressions of the mice using an artificial intelligence algorithm based on a convolutional neural network, and movement-induced pain by analyzing the exploratory activity of animals using an infrared actimeter. The abdominal sensory threshold decreased from 1.7g to 0.06g at 4h after laparotomy. This threshold was maintained until day 3, and was gradually restored until it was completely normalized on day 10 after surgery. Our artificial intelligence algorithm detected 13.89% of frames in which the laparotomized animals showed painful faces in recordings made at 4h after surgery, while this value was only 3.34% in the control group. Furthermore, laparotomy induced a prominent decrease in the exploratory activity of the animals (76.01 vs 41.94m in 15 minutes of evaluation). Subcutaneous administration of ibuprofen (64 mg / kg) almost completely reversed skin hypersensitivity (76.77%; $p < 0.01$) and pain at rest (73.65%; $p < 0.05$). However, pain induced by movement was resistant to the effect of ibuprofen, so that this drug was able to reverse only 59.37% of the decrease in exploratory activity induced by the surgical process. Therefore, we consider that