



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

---

---

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACION

**CLONACION Y CARACTERIZACION DE  
PRECURSORES BIOSINTETICOS DE SECUENCIAS  
PEPTIDICAS TIPO ENDOMORFINAS**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN INVESTIGACION EN MEDICINA**

P R E S E N T A

**M.C./ M. C. Q. FELIPE LEFF GELMAN**

DIRECTORES DE TESIS:

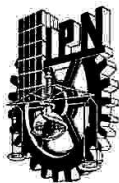
DR. BENITO ANTON PALMA

DRA. NORMA E. HERRERA GONZALEZ



México D.F.

Septiembre, 2007



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISION DE TESIS*

En la Ciudad de México siendo las 13:00 horas del día 27 del mes de abril del 2007 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESM para examinar la tesis de grado titulada:

**"CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PRECURSORES BIOSINTÉTICOS DE SECUENCIAS PEPTÍDICAS TIPO ENDOMORFINAS"**

Presentada por el alumno:

LEFF  
Apellido paterno

GELMAN  
materno

FELIPE  
nombre(s)

Con registro: 

A	0	2	0	0	8	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de:

DOCTOR EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

DR. GUILLERMO MANUEL CEBALLOS REYES  
PRESIDENTE DEL JURADO

DRA. GUADALUPE CLEVA VILLANUEVA LÓPEZ  
SECRETARIO DEL JURADO

DR. BENITO ANTÓN PALMA  
1ER. VOCAL DEL JURADO

DRA. NORMA ESTELA HERRERA GONZÁLEZ  
2DO. VOCAL DEL JURADO

DR. PEDRO LÓPEZ SANCHEZ  
3ER. VOCAL DEL JURADO

DR. JOEL LOMELI GONZÁLEZ  
VOCAL SUPLENTE

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

M. EN C. ELEAZAR LARA PADILLA



SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
I. P. N.  
SECRETARÍA DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México el día 12 de Febrero del 2007, el que suscribe **Felipe Leff Gelman**, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias en Investigación en Medicina con número de registro **A020082**, adscrito a la Escuela Superior de Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Benito Antón Palma** (tutor de tesis, INPRFM) y la Dra. Norma E. Herrera González Herrera (cotutora de tesis, ESM=IPN) y la Codirección del **Dr. Guillermo Manuel Ceballos Reyes**, cede los derechos del trabajo intitulado **“CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PRECURSORES BIOSINTÉTICOS DE SECUENCIAS PEPTÍDICAS TIPO ENDOMORFINA”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas, figuras, y/o datos del trabajo experimental sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [pleff@imp.edu.mx](mailto:pleff@imp.edu.mx). Sí el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
M. en C. Felipe Leff Gelman

*El presente trabajo de investigación se realizó en  
el Laboratorio de Neurobiología Molecular y  
Neuroquímica de Adicciones; División de  
Investigaciones Clínicas del Instituto Nacional de  
Psiquiatría, Ramón de la Fuente Muñiz,  
México D.F.,  
bajo la supervisión y asesoría del  
Dr. Benito Antón Palma.  
Investigador en Ciencias Médicas “F”  
INSSSA/INPRFM*



## **AGRADECIMIENTOS**

*AGRADEZCO INFINITAMENTE LA SUPERVISIÓN,  
ASESORIA Y CONDUCCIÓN DE ESTA TESIS A LA DRA.  
NORMA E. HERRERA GONZÁLEZ, QUE FUNGIÓ COMO CO-  
TUTORA Y CO-DIRECTORA DE ESTA TESIS EN LA  
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA DEL INSTITUTO  
POLITÉCNICO NACIONAL, MÉXICO D.F.*

*AGRADEZCO A CADA UNO DE LOS MIEMBROS DEL  
JURADO, CUYOS COMENTARIOS Y OBSERVACIONES  
DURANTE LOS SEMINARIOS PERMITIERON EL AVANCE  
CONTINUO DE ESTE TRABAJO DE TESIS; ASÍ COMO EL  
MANUSCRITO FINAL DEL MISMO.*

*AL DR. GUILLERMO CEBALLOS, DIRECTOR DE  
POSGRADO DEL ESM/IPN,  
POR SU APOYO, CONFIANZA EN EL DESARROLLO,  
CONDUCCIÓN DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN  
CIENCIAS MÉDICAS Y POR SU APOYO CONTINUO PARA  
LOGRAR LA EJECUCION DE ESTA TESIS;*

*A CADA UNA DE LAS PERSONAS QUE COLABORARON EN  
EL DESARROLLO DE ESTE PROYECTO, CON SUS  
COMENTARIOS, APORTACIONES, SUGERENCIAS,  
TRABAJO EXPERIMENTAL DESARROLLADO EN EL  
LABORATORIO;*

## **AGRADECIMIENTOS**

*AGRADEZCO EL APOYO FINANCIERO QUE OTORGARÓN A LO LARGO DE MÁS DE 10 AÑOS PARA EL DESARROLLO DE LOS DIFERENTES PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS EN EL LABORATORIO DEL DR. BENITO ANTÓN;*

*PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRIA RAMON DE LA FUENTE*

*FUNDACIÓN GONZALO RIO ARRONTE A.C;*

*CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA*

*Y TECNOLOGIA (CONACYT);*

*INSTITUTOS NACIONALES DE SALUD-SSA,*

*CONSEJO NACIONAL CONTRA LAS*

*ADICCIONES (CONADIC-SSA);*

# DEDICATORIAS

*A MI PADRE DE BENDITA MEMORIA (TZ"l)  
POR SU GUIA, CONSEJOS Y  
DIRECCION A LO LARGO DE MI VIDA;*

*A MI MADRE, POR SU APOYO,  
CARIÑO Y GUIA EN MI VIDA;*

*A MI HIJO ISHAY CON TODO  
MI AMOR Y ENTRAÑABLE  
PACIENCIA;*

*A ISRAEL MIZRAJI, POR SU APOYO  
Y GUIA ESPIRITUAL A LO LARGO  
DE VARIOS AÑOS;*

*A MI HERMANO POR SU  
APOYO Y CARIÑO*

*A BENITO ANTÓN, POR SU ENSEÑANZA  
QUE ME DIO EL LUGAR PARA LOGRAR GRANDES  
FRUTOS EN MI CARRERA CIENTIFICA Y PROFESIONAL  
A LO LARGO DE ESTOS AÑOS;*

*A MAURA MATUS Y JUAN C. CALVA POR  
SU APOYO EN EL DESARROLLO DE ESTA TESIS  
Y MI CARRERA CIENTIFICA;*

*A LENIN POR TU APOYO, CONFIANZA Y  
AMISTAD PERDURABLE;*

## **DEDICATORIAS**

*AL DR. GERHARD HEINZE, DIRECTOR DEL INPRFM,  
POR SU ENTRAÑABLE AMISTADA, CONSTANTE  
APOYO, CONSEJOS Y GUIA SOBRE EL IMPACTO  
Y DESARROLLO CIENTIFICO DE MI CARRERA  
PROFESIONAL;*

*A LA LIC. ANA DE LA PARRA  
POR SU AMISTAD Y CONSTANTE  
APOYO EN LA REALIZACION DE  
MULTIPLES PROYECTOS;*

*AL DR. RICARDO NANNI POR SU ENTANABLE  
AMISTAD Y APOYO EMOCIONAL EN  
MOMENTOS CRITICOS;*

*AL CARLOS BERLANGA C.  
SUBDIRECTOR DE LA DIVISION DE  
INVESTIGACIONES CLÍNICAS; POR  
SU APOYO CONSTANTE Y AMISTAD;*

*A TODO EL PERSONAL DEL INPRFM  
DEL CUAL TUVE SIEMPRE SU  
APOYO, CONFIANZA Y AMISTAD;*

---

<b>RESUMEN.....</b>	<b>i-ii</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>iii</b>
<b><i>I. ANTECEDENTES GENERALES DEL PROYECTO DE TESIS.....</i></b>	<b><i>1-9.</i></b>
<b>1.0 HORMONAS PEPTÍDICAS Y PÉPTIDOS NEUROACTIVOS.....</b>	<b>1-9.</b>
a). <b>Introducción.....</b>	<b>1-2.</b>
b). <b>Relación Estructura-Función /neuropéptidos.....</b>	<b>2-4.</b>
c). <b>Síntesis y rutas subcelulares de modificación postraduccional de precursores proteicos de péptidos neuroactivos.....</b>	<b>6-8.</b>
d). <b>Mecanismos enzimáticos responsables de la modificación postraduccional de precursores proteicos de péptidos neuroactivos.....</b>	<b>8-9.</b>
<b><i>II. ANTECEDENTES ESPECIFICOS DEL PROYECTO DE TESIS...10-17.</i></b>	
<b>1.0 ACERCAMIENTOS EXPERIMENTALES DIRIGIDOS HACIA LA BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS NEUROPÉPTIDOS BIOACTIVOS.....</b>	<b>10-13</b>
a). <b>Generalidades. ....</b>	<b>10-11.</b>
b). <b>Farmacología inversa de receptores huérfanos. ....</b>	<b>10.</b>
c). <b><i>Técnicas cuantitativas empleadas para la búsqueda, identificación y caracterización estructural de péptidos bioactivos.....</i></b>	<b>11.</b>
d). <b><i>Tecnología de espectrometría de masas.....</i></b>	<b>11.</b>
e).- <b><i>Anticuerpos policlonales y monoclonales empleados para identificar, aislar y caracterizar la estructura de péptidos bioactivos. ....</i></b>	<b>12-13.</b>
f).- <b>Estrategias inmunomoleculares empleadas en la identificación y caracterización estructural de péptidos bioactivos.....</b>	<b>13.</b>



---

<b>2.0 . GENERALIDADES SOBRE LA ENDOMORFINAS.....</b>	<b>14-17.</b>
a).- Identificación y caracterización estructural y funcional de precursores proteicos de la familia de diferentes péptidos opioides en el SNC de mamíferos.....	14-15.
b). -Identificación y caracterización farmacológica de subtipos de receptores opioides.....	15.
c).- Endomorfina nuevos ligandos peptídicos del receptor opioide $\mu$ .....	15-17.
<b>III. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES PRELIMINARES.....</b>	<b>18-22.</b>
1.- Ensayos de inmunoblot-dot.....	18.
2.-Radioinmunoensayo (RIA) en fase sólida .....	18-20.
<b>IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA EXPERIMENTAL Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS.....</b>	<b>23.</b>
<b>V. HIPÓTESIS GENERAL DE TRABAJO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>24-25.</b>
<b>VI. OBJETIVOS EXPERIMENTALES: Generales y Particulares.....</b>	<b>26-27.</b>
<b>VII.. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>28-37.</b>
1).-Procedimientos inmunomoleculares para identificar y caracterizar insertos de ADNc que codifican los precursores proteicos de las EM1-2 en transformantes bacterianas.....	28-35.
a).- Procedimientos moleculares de transfección y amplificación de un banco de expresión de ADNc del cerebro total de ratón.....	28-29.
b).- Lisis bacteriana y ensayos de inmunoblot-dot.....	30-31.
c).- Amplificación y purificación de plásmidos vectores.....	32.
d).- Análisis de restricción de los insertos de ADNc de la clonas candidatas identificadas.....	32-33.

---

e).- Amplificación de los insertos de ADNc de clonas identificadas por técnicas estándares de PCR. ....	33-34.
f).- Secuenciación nucleotídica y análisis estructural por electroferograma de los insertos de ADNc de las clonas inmunopositivas.....	35.
g).- Caracterización de la identidad estructural de los insertos de ADNc clonados y sus productos proteicos de traducción. ....	35-36.
2.- Ensayos de radioligando-receptor.....	36-37.

**VIII. RESULTADOS.....38-50.**

1).- Identificación, aislamiento y caracterización estructural de un nuevo ARNm (ADNc) que codifica una secuencia peptídica-tipo EM-2 en una proteína de alta masa molecular en el SNC de mamíferos.....	72-89.
a).- Identificación, aislamiento y clonación de transformantes bacterianas inmunopositivas. ....	38-40.
b).- Determinación de la pureza y tamaños moleculares de las clonas inmunopositivas identificadas por análisis de restricción y técnicas de amplificación por PCR.....	41-43.
c).- Secuenciación nucleotídica y caracterización de la homología estructural del inserto de ADNc de la clona 9.2. ....	43-45.
d).- Caracterización estructural del inserto de ADNc/ 9.2.....	46-48.
e).- Caracterización estructural del producto proteico codificado por el inserto de ADNc de la clona 9.2.....	49-52.
e).- Caracterización de la unión del segmento peptídico invertido de la endomorfin-2 por el receptor opioide mu.....	53-55.

**IX. DISCUSION..... 56-62**

**X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....63-76.**

**XI. ADENDUM :**

- 1.- Manuscrito del artículo de tesis (Antón y col., 2008)

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1.....	4.
Figura 1.....	21.
Figura 2.....	42.
Figura 3.....	25.
Figura 4.....	29.
Figura 5.....	31.
Figura 6.....	34.
Figura 7.....	40.
Figura 8.....	42.
Figura 9.....	44.
Figura 10.....	48.
Figura 11.....	50-51.
Figura 12.....	55.



**I. ANTECEDENTES GENERALES**

**1.0 HORMONAS PEPTÍDICAS Y PÉPTIDOS NEUROACTIVOS.**

**a). Introducción.-** Un gran número de mensajeros químicos, con funciones modulatorias sobre la actividad nerviosa, neuroendocrina y hormonal son de naturaleza peptídica (Strand, 1999; Brownstein, 1993). Los estudios de caracterización estructural del genoma de mamíferos postulan la existencia de un número aproximado de 26 000 a 35 000 genes funcionales, de los cuales casi un 1% de ellos pudiesen codificar proteínas precursoras de péptidos bioactivos (Venter y col., 2001). En la actualidad, se han identificado y caracterizado molecularmente más de 300 sustancias endógenas de naturaleza peptídica (GENBANK) de las cuales, en los vertebrados, más del 50% resultan estar amidadas en el último aminoácido del extremo carboxilo-terminal del péptido en tanto que, en los invertebrados (v.g., *Drosophila*) > 90% son péptidos amidados (Hewes and Taghert, 2001).

Actualmente, la Sociedad Internacional de Neuropeptidos, ha propuesto una definición más amplia para estos agentes endógenos neuroactivos (Kastin, 2000) dada la amplia variedad de péptidos biológicamente activos que muestran acciones de tipo hormonal y acciones neurotransmisoras/neuromoduladoras tanto en sistemas nerviosos como neuroendocrinos en múltiples organismos (Vg., somatostatina, gastrina/colecistocinina,  $\beta$ -endorfina) (Mains y Eipper, 1999; Kandel y col., 2000). Mas aun, diversos estudios de inmunohistoquímica a lo largo de más de cuatro décadas, han demostrado que diferentes péptidos bioactivos de origen neuronal y/o neuroendocrino, están comúnmente localizados en gránulos o vesículas de secreción conjuntamente neurotransmisores convencionales (Hökfelt 1991, Lundberg y col., 1983). Esta colocalización celular ha permitido ampliar más el conocimiento de la neurotransmisión en el SNC, como un fenómeno *pluripotencial*, donde los péptidos bioactivos secretados al espacio sináptico, modulan la actividad sináptica de múltiples neurotransmisores convencionales (Vg., aminas biogénicas) (Kandel y col., 2000).

Estudios de análisis estructural de péptidos bioactivos, han demostrado que una gran mayoría de las secuencias primarias consenso de péptidos neuroactivos identificados en tejidos neurales en múltiples especies a lo largo de la escala filogenética, muestran una estrecha homología estructural entre sí, lo que ha favorecido la agrupación de estos en distintas familias y subfamilias de péptidos



bioactivos (ver tabla 1) (Darlison & Richter, 1999; Kandel y col., 2000). Como se aprecia en la tabla I, la familia de la vasopresina y oxitocina (Du Vigneaud y col., 1953) representan ejemplos claros de péptidos estructuralmente relacionados filogenéticamente (Vg., isotocina, mesotocina y oxitocina) cuya homología estructural y linaje molecular, esta fisiológicamente mas relacionados con actividades de tipo reproductivo, que con respecto a actividades de regulación del balance electrolítico (Vg., vasotocina y vasopresina) (Acher y cols., 1995; Hoyle, 1998).

Otros ejemplos representativos de péptidos estructuralmente relacionados, donde el linaje molecular correlaciona con las funciones biológicas de péptidos bioactivos, es la superfamilia de la *somatostatina* y la *cortistatina*, así como la familia de las *neurokininas*, la familia de las *gastrina/colecistokinina*, y la familia de la *insulina*, la familia de la *urocortina* (UI/UII) y el factor liberador de la corticotropina (CRH), en adición a la superfamilia de péptidos opioides identificados y caracterizados funcionalmente en tejidos neurales y neuroendocrinos en diversas especies mamíferas y no mamíferas (ver tabla 1) (Kandel y col., 2000; Darlison & Richter, 1999).

### **b). Relación Estructura-Función de los neuropéptidos: Aspectos generales.-**

Diversos estudios relacionados a la identificación, caracterización, clonación y análisis estructural de secuencias de ARN mensajeros (ARNms) o ADN complementarios (ADNc) extraídos de tejidos neurales o células neuroendocrinas y subclonados en sistemas celulares de expresión genómica (Stratagene, 2000) han demostrado que los precursores proteicos polipeptídicas codificados en las secuencias nucleotídicas consenso, contienen inscrito múltiples copias de secuencias de péptidos bioactivos, como es el caso del precursor proteico *proencefalina A* (Noda y col., 1982); el precursor proteico *FMRF-amida* (FMRF-NH<sub>2</sub>) (Ono y McCaman, 1992) y el precursor polipeptídico de las *enterinas* (Furukawa y col., 2001) entre muchos otros; los cuales tienen codificado en su secuencia consenso de aminoácidos, cinco copias del péptido, *metionina-encefalina* (ME);  $\cong$  30 copias del péptido FMRF-NH<sub>2</sub> y  $\cong$  35 copias de 19 nanopéptidos similares, denominados *enterinas*, respectivamente. Esta capacidad de un ARNm de codificar múltiples copias de un determinado péptido bioactivo en un precursor polipeptídico común, ha sugerido que los ARNm policistrónicos como sus productos proteicos de traducción, sirven como mecanismos de amplificación molecular para facilitar la síntesis como el procesamiento enzimático postraducciona l de sus precursores biosintéticos y la

generación de múltiples copias de péptidos bioactivos, con el objetivo de promover y asegurar la correcta activación de receptores específicos posinápticos en las neuronas blanco (cuya activación esta en función de la concentración sináptica del ligando-peptídico) así como el de consolidar las respuestas celulares generadas y facilitar la correcta modulación de la transmisión nerviosa en las vías neuronales destinadas a generar respuestas funcionales o conductuales determinadas (Kandel y col., 2000; Sossin y col., 1989).

Mas aun, los estudios de identificación, clonación y análisis estructural de múltiples ARNms (NCBI/GENBANK) que codifican una amplia variedad de precursores proteicos polipeptídicos, han demostrado que un precursor polipeptídico común, es capaz de tener codificado en su secuencia consenso, secuencias activas de distintos péptido funcionales, que generan respuestas farmacológicas opuestas, de tipo agonista o antagonista, como es el caso de los neuropéptidos codificados y derivados del precursor de la *nociceptina/orfanina FQ (OFQ)*; el cual genera un péptido con funciones fisiológicas agonistas, denominado *nociceptina* u *orfanina FQ* y otro péptido con funciones antagonistas, denominado *nocistatina* (Darland y col., 1998). La nociceptina es un péptido neuroactivo, previamente identificado y aislado del cerebro de mamíferos, que induce respuestas *hiperalgésicas* en el animal *in vivo* (Meunier y col., 1995; Reinscheid y col., 1995) a través de la activación de su receptor opioide (de alta afinidad y selectividad) ORL-1 (Mollereau y col., 1994; Bunzow y col., 1994); en tanto que, la nocistatina produce respuestas antagónicas de tipo *antinociceptivo* en el SNC de roedores, moduladas a través de un receptor huérfano acoplado a proteína G, aún no identificado (Okuda-Ashitaka y col., 1998).

Tabla 1.- Ejemplos representativos de secuencias estructurales consenso de familias de péptidos neuroactivos

A.- Somatostatina y Corticostatina

Somatostatina-28	( <i>Rattus</i>	<i>norvegicus</i> )
SANSNPAMAPRERKAGCKNFFWKFTFTSC		
Somatostatina-28	( <i>Homo sapiens</i> )	
SANSNPAMAPRERKAGCKNFFWKFTFTSC		
Corticostatina-29	( <i>Rattus</i>	<i>norvegicus</i> )
QERPLQPPHRDKKPCNFFWKTFSSCK		
Corticostatina-29	( <i>Homo sapiens</i> )	
QEGAPPQQSARRDRMPCRNFFWKTFSSCK		

B.- Péptidos opioides

Leu-encefalina	( <i>Homo sapiens</i> )	YGGFL
Orfanina FQ	( <i>Homo sapiens</i> )	FGGFTGARKSARKLANQ
Dinorfina A	( <i>Homo sapiens</i> )	YGGFLRRIRPKLKWDNQ
Dinorfina B	( <i>Homo sapiens</i> )	YGGFLRRQFKVVTRSQEDPNAYSGELFDA
Met-Encefalina	( <i>Homo sapiens</i> )	YGGFM
β-Endorfina	( <i>Homo sapiens</i> )	YGGFMTSEKSQTPLVTLFKNAIKNAYKKGE
Endomorfina-1	( <i>Bos taurus</i> )	YPWF
Endomorfina-2	( <i>Bos taurus</i> )	YFFF

C.- Vasopresina, oxitocina y péptidos relacionados

Vasopresina	( <i>Homo sapiens</i> )	CYFQNCPRG
Vasotocina	( <i>Catostomus commersoni</i> )	CYIQNCPRG
Connopresina	( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	CFIRNCPKG
Cafalotocina	( <i>Octopus vulgaris</i> )	CYFRNCPIG
Isotocina	( <i>Catostomus commersoni</i> )	CYISNCPIG
Aspargtocina	( <i>Squalus acanthias</i> )	CYINNCPLG
Mesotocina	( <i>Bufo japonicus</i> )	CYIQNCPIG
Oxitocina	( <i>Homo sapiens</i> )	CYIQNCPLG

D.- Factor liberador de corticotropina (CRF) y péptidos relacionados

CRF	( <i>Homo sapiens</i> )	<i>sapiens</i> )
SEEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII		
CRF	( <i>Catostomus</i> )	
SEEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEIF		
CRF	( <i>Xenopus</i> )	<i>laevis</i> )
AEEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMDII		
Urocortina	( <i>Homo sapiens</i> )	
DNPSLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRRIIFDSV		
Urotensina I	( <i>Catostomus</i> )	
NDDPPISIDLTFHLLRNMIEMARIENEREQAGLNRKYLDEV		
Sauvagina	( <i>Phyllomedusa</i> )	
QGPPISIDLSLELLRKMIEIEKQEKEKQQAANNRLLLDTI		

Tabla y texto adaptado de Darlison & Richter (1999). Los sitios que muestran pares de amino ácidos básicos (RR, KR) se encuentran subrayados. En amarillo se muestra la homología estructural de las secuencias primarias de aminoácidos conservados entre los diferentes neuropéptidos agrupados en sus correspondientes familias, conforme a su identidad estructural. Esto demuestra la conservación de aminoácidos entre diversos péptidos bioactivos a lo largo del curso de la evolución.

**c). Síntesis y rutas subcelulares de modificación postraduccional de precursores proteicos de péptidos neuroactivos.-** Un rasgo característico de los mecanismos moleculares que regulan la síntesis, metabolismo y secreción de los neuropéptidos, es que estos difieren completamente de los mecanismos celulares biosintéticos de los neurotransmisores convencionales con respecto a la localización subcelular de síntesis, transporte y almacenamiento vesicular (vesículas sinápticas) y secreción exocítica (Mains & Eipper, 1999; Edwards, 1992). En este contexto, los péptidos bioactivos identificados en el SNC resultan ser sintetizados en el cuerpo celular/soma de las neuronas, a partir de precursores proteicos polipeptídicos de alta masa molecular, los cuales son inicialmente sintetizados en el retículo endoplásmico rugoso (rER), transportados subsecuentemente al aparato de Golgi, a través de gránulos o vesículas de transición, donde sufren importantes modificaciones postraduccionales, que les permiten ser almacenados subsiguientemente, en gránulos de secreción inmaduros, mismos que son transformados en vesículas de secreción de núcleo denso (LDCV, por sus siglas en inglés) durante el transporte axonal a terminales nerviosas presinápticas, donde son procesados para su exocitosis como péptidos bioactivos maduros (Sossin y col., 1989; Fisher y col., 1988). En este contexto, los mecanismos moleculares comúnmente empleados por las células neuronales y neuroendocrinas durante la síntesis de precursores proteicos polipeptídicos (Sossin y col., 1989) incluyen principalmente; la transcripción de la secuencia de ADN del gen codificante en un ARN heteronuclear (hnARN); el proceso de "splicing" alternativo del hnARN y la generación de un ARNm maduro dentro del compartimiento nuclear y la traducción del ARNm en productos polipeptídicos por el sistema polirribosomal del rER (Lewin, 2000).

Los mecanismos de procesamiento postraduccional de precursores polipeptídicos codificados por sus respectivos ARNm específicos, en las células eucariotas, están ligados a los mecanismos moleculares de síntesis y modificación cotraduccional de los productos proteicos por el sistema microsomal del rER, en un evento biosintético denominado translocación cotraduccional que determina la etapa inicial de la ruta biosintética de las proteínas de exportación (Lewin, 2000). Durante esta fase, la secuencia peptídica consenso que da origen a la estructura primaria de un precursor proteico polipeptídico, durante el proceso de cotraducción de los ARN mensajeros (mismos que se encuentran anclados al sistema polirribosomal del rER) es rápidamente internalizado al compartimiento luminal del rER (translocación cotraduccional) (Lewin, 2000) en donde la secuencia peptídica del extremo NH<sub>2</sub>-



terminal del polipéptido, denominada *péptido líder* o *péptido señal*, compuesto por  $\cong$  25-30 residuos de aminoácidos, es rápidamente escindida del resto del polipéptido, durante los primeros minutos de la síntesis proteica que ocurre en el espacio ribosomal del rER (Lewin, 2000; Crowley, 1994; Walter & Blobel, 1981). El péptido líder forma parte de la conformación estructural de todos los precursores proteicos inactivos o “preproteínas” (Lewin, 2000; Mains y Eipper, 1999). Diversos estudios han demostrado, que la naturaleza hidrofóbica del *péptido señal*, es esencial para dirigir y favorecer la unión específica del polipéptido a dominios membranales específicos del rER. Asimismo se ha demostrado, que el péptido señal determina: a).- la formación de un poro o canal membranal, definido como “*translocon*”, mismo que esta estructurado por la asociación de diferentes subgrupos de ribonucleoproteínas ( $\cong$  240 kDa) denominadas “*partículas de reconocimiento de señales peptídicas* o *SRP*” (signal recognition particle, por sus siglas en ingles) y un receptor proteico membranal, que facilita la adherencia de los poliribosomas y por tanto, el proceso de traducción y translocación de polipéptidos al interior del rER (Lewin, 2000); b).- la translocación de la proteína naciente al espacio luminal del rER y la escisión de la secuencia señal o péptido líder de los precursores proteicos polipeptídicos, mediante endopeptidasas específicas (signal peptidase, por sus siglas en ingles) que se encuentran asociadas a la region luminal del translocon (Lewin, 2000).

En este contexto, el rER representa un sistema de control de calidad para las proteínas de exportación, a través del cuál, estas sufren procesos postraduccionales de glicosilación (manosas), sulfatación y acetilación, y adquieren sus conformaciones estructurales, estabilidad química y características funcionales de las proteínas exportadas a la ruta de secreción exocítica (Lewin, 2000).

Mas aun, diversos estudios celulares enfocados a la localización subcelular y transporte citoplásmico de proteínas de secreción, han demostrado que todas las proteínas recién sintetizadas, que son modificadas postraduccionalmente por mecanismos enzimáticos de glicosilación temprana en el rER, pasan “en ruta”, por el aparato de Golgi (Hammerschlag y col., 1982). En este contexto, toda proteína como precursor proteico polipeptídico son expuestos a modificaciones estructurales adicionales, como es la incorporación de oligosacáridos complejos (v.g., N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina) y otros componentes moleculares (v.g., ácido siálico) sobre residuos de aminoácidos específicos (Vg., Ser, Thr, Asp) (Lewin, 2000).

Estos procesos de modificación postraduccional determinan, no solo las propiedades funcionales de múltiples glucoproteínas, sino que además, facilitan el señalamiento “químico” en dominios estructurales en los precursores proteicos polipeptídicos, para facilitar la generación de péptidos bioactivos maduros, mediante la actividad enzimática de proteasas-proconvertasas-PC1/PC3 (ver adelante, inciso inferior) (Mains & Eipper, 1999; Horton & Ehlers, 2003).

Finalmente, los mecanismos implicados en la modificación postraduccional de los precursores polipeptídicos tiene lugar en la membrana interna de los gránulos de secreción o endosomas en las células secretoras que los originan (Mains y Eipper, 1999).

**d). Mecanismos enzimáticos responsables de la modificación postraduccional de precursores proteicos de péptidos neuroactivos.-** Los precursores proteicos de péptidos bioactivos inician sus procesos de modificación postraduccional en el rER, donde el péptido señal que estructura la secuencia “pre” en las moléculas precursoras inactivas (*preprolipéptido*) es escindido para proceder a su transformación estructural en un “prolipéptido o prohormona”. Este procesamiento continua en el *aparato de Golgi*, o en su caso, dependiendo de tipo y estructura de la *proproteína*; esta última puede ser completamente procesada en forma rápida en el rER, por endopeptidasas, para así, proceder su ruta metabólica de modificación postraduccional en endosomas mediante proteasas-dependientes de calcio, que escinden la secuencia consenso “pro” del precursor polipeptídico (Mains y Eipper, 1999). Finalmente, las secuencias activas de péptidos funcionales codificadas en el fragmento polipeptídico es procesado por enzimas proteolíticas intravesiculares denominadas “*proconvertasas de hormonas*” (Vg., PC1/3 y PC2, PC4, PC5/6, PC7/8/LPC y PACE4) (Seidah y cols., 1998; Steiner, 1998) cuya expresión celular y actividad funcional en el tejido nervioso y órganos de secreción neuroendocrina, resulta ser dependiente del tejido y/o células que las codifican y expresan (Mains y Eipper, 1999; Goldman & Zubay, 1998). Las actividades enzimáticas de tipo tripsina y carboxipeptidasa en las *proconvertasas*; favorecen la generación de diferentes péptidos bioactivos maduros, al reconocer y escindir los pares de aminoácidos básicos tipo de la arginina y la lisina (Arg, Lys) que flanquean el extremo amino- y carboxilo- terminal en la secuencia activa del péptido bioactivo codificado en el precursor proteico (Mains y Eipper, 1999; Goldman & Zubay, 1998; Sossin y col.,

1989; al-Yousuf y col., 1993; Simpson y col., 1995). Un ejemplo representativo de un procesamiento enzimático diferencial en áreas del SNC, lo muestra la proopiomelanocortina (POMC); precursor polipeptídico de hormonas peptídicas y neuropéptidos, como es la  $\beta$ -endorfina, ACTH,  $\alpha$ - y  $\beta$ -MSH.

En adición, una gran mayoría péptidos bioactivos escindidos de sus precursores proteicos polipeptídicos, resultan ser modificados mediante procesos enzimáticos de  $\alpha$ -amidación (ver inciso A de este segmento), a través de la actividad de un complejo enzimático de  $\alpha$ -amidación, denominado *PAM* (peptidilglicil- $\alpha$ -hidroxilante-mono-oxigenasa) y *PAL* (peptidilglicil- $\alpha$ -hidroxiglicina  $\alpha$ -amidante-liasa) (Eipper y col., 1992; Fraboulet y col., 1996; Kato y col., 1990) que regulan la incorporación de grupos funcionales amino (-NH<sub>2</sub>) sobre el carbón-asimétrico del último residuo de aminoácido (Vg., X-CO-NH<sub>2</sub>) en la secuencia peptídica.

Aunque este proceso ocurre con muy alta frecuencia en células que sintetizan y secretan péptidos neuroactivos; este proceso ocurre solamente en la situación de que el precursor polipeptídico tenga codificado en su secuencia consenso, la señal consenso de amidación representada por el residuo de glicina (Gli), que resulta estar localizada en el extremo carboxilo-terminal del péptido bioactivo por amidar (Eipper y col., 1992, 1993). De esta forma, múltiples péptidos bioactivos resultan estar amidados el extremo carboxilo-terminal, y ejemplos representativos de estos es el péptido bioactivo; NPY (X-Leu-NH<sub>2</sub>); la sustancia P (X-Fen-CO-NH<sub>2</sub>); la secretina (X-Val-CO-NH<sub>2</sub>); el péptido FMRF-amida (Val-CO-NH<sub>2</sub>) (Mains y Eipper, 1999) y las *endormorfinas 1 y 2* (-X-Fen-CO-NH<sub>2</sub>) (Zadina y col., 1997) (ver tabla 1 y sección de antecedentes específicos) entre muchos otros.

**II. ANTECEDENTES ESPECIFICOS DEL PROYECTO DE TESIS**

**1.0 ACERCAMIENTOS EXPERIMENTALES DIRIGIDOS HACIA LA BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS NEUROPEPTIDOS BIOACTIVOS.**

**a). Generalidades.-** Diversas metodologías se han empleado para identificar y caracterizar estructuralmente y funcionalmente nuevas sustancias peptídicas con actividades biológicas de tipo neurotransmisor/neuromodulador y/o hormonal. Estas metodologías incluyen aplicaciones de distintos bioensayos de naturaleza conductual, electrofisiológico e inmunológico en adición, de aquellos concernientes a la aplicación de la tecnología recombinante de ADN.

Aunque todavía no existe una aproximación metodológica estándar para la detección, aislamiento y caracterización estructural de nuevas sustancias peptídicas biológicamente activas, la mayoría de las metodologías aplicadas para estos fines, están enfocadas hacia la búsqueda de moléculas bioactivas, que requieren del diseño y la aplicación de técnicas bioquímicas y moleculares para facilitar la identificación, aislamiento y la caracterización estructural y molecular inicial del producto peptídico codificado en un ARNm específico.

Finalmente, la caracterización funcional de moléculas bioactivas de naturaleza peptídica, requieren del empleo de bioensayos específicos para identificar las actividades funcionales y/o fisiológicas de la sustancia peptídica endógena de expresada en regiones neuronales del SNC de mamíferos.

En este contexto, la aplicación de ensayos biológicos cuantitativos diseñados específicamente para identificar las acciones biológicas que producen múltiples péptidos en tejidos neurales o extraneurales, permitió el aislamiento y la subsiguiente identificación y clonación de péptidos bioactivos como la sustancia P (Gryz y col., 1977; Leeman y cols, 1977, 1975); la colecistokinina (CCK) (Deschenes y col., 1984; Eng y col., 1982) hormonas de origen hipotálmico (Vg., TRH, GnRH) (Brownstein y col., 1974; Brownstein, 1977; Yahalom y col., 1999; Yu y col., 1997; Schally y col., 1971) incluyendo péptidos derivados del las cromogranina A extraídos de los gránulos cromafines de la glándula adrenal (Parmer y col., 2000; Ischia y col., 1997; Taupenot y col., 1995; Sigafos y col., 1993; Cetin y col., 1993) entre muchos otros. Mas aun, con el advenimiento de ensayos de unión de radioligando-receptor, empleando trazadores marcados con isótopos radioactivos ( $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ) se logro la

identificación y clonación de diferentes péptidos opioides ( $\beta$ -endorfina, encefalinas, dinorfinas) (Li y Chung, 1976; Hughes y col., 1975; Goldstein y col., 1979) y de sus precursores polipeptídicos (POMC, proencefalina A, prodinorfina o proencefalina B) lo que conllevó a la identificación y clonación subsiguiente de sus receptores proteicos de alta afinidad ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ) respectivamente (Chavkin y col., 1982; Bradbury y col., 1976; Raynor y col., 1994).

**b). Estrategias experimentales de farmacología inversa de receptores huérfanos.-** Una estrategia alternativa empleada muy recientemente en la identificación y caracterización funcional de péptidos bioactivos, es la referente a la farmacología inversa. Esta estrategia ha sido ampliamente utilizada en la última década, para identificar ligandos endógenos de receptores ‘huérfanos’ que carecen aun de la identificación de sus ligandos endógenos fisiológicamente relevantes en la actividad neural. Esta estrategia farmacológica denominada “*estrategia de receptor huérfano acoplado a proteínas G*” esta basada en técnicas moleculares de transfección de un ADNc que codifica un receptor huérfano en una célula receptora y cuya expresión funcional es monitoreada, a través de la exposición de una mezcla heterogénea de moléculas aisladas y purificadas a partir de extractos titulares. El ligando peptídico endógeno del receptor huérfano, presente en el extracto tisular va a ser capaz entonces, de inducir la activación de sistemas de señalamiento intracelular (AMPC)-dependientes de la activación de proteínas G, mismas que resultan estar acopladas a la activación del receptor huérfano, expresado funcionalmente en sistemas celulares heterólogos (Civelli y col., 2001; Civelli y col., 1998).

Esta estrategia de farmacología inversa de receptores “huérfanos”, permitió la identificación y caracterización funcional de varios péptidos o familias de péptidos bioactivos expresados en el SNC de mamíferos, tales como la *nociceptina/orfanina FQ* (Meunier y col., 1995; Reinscheid y col., 1995); las hipocretinas/orexinas (Hcrts/Oxs), el péptido hipotálmico-liberador de prolactina (PrRP); la Urotensina II; Neuromedina U, y la hormona concentradora de melanocitos (MCH, por sus siglas en inglés) (Civelli y col., 2001; Civelli y col., 1998). Un ejemplo característico del empleo de esta estrategia experimental, es la referente a la identificación de la *Urotensina II humana* (hUII) (Coulouarn y cols., 1998) el cual permitió identificar y caracterizar la estructura molecular del receptor huérfano de esta neurohormona, denominado GPR14 (Ames y col., 1999).



**c). Técnicas cuantitativas empleadas para la búsqueda, identificación y caracterización estructural de péptidos bioactivos.-** Otro acercamiento metodológico comúnmente empleado para la búsqueda de péptidos bioactivos con actividad neuromoduladora, son las técnicas cuantitativas de detección química, que permiten identificar estructuras químicas específicas que frecuentemente presentan múltiples moléculas peptídicas como es la acetilación, fosforilación y la amidación en residuos de aminoácidos localizados en el extremo carboxilo terminal de la secuencia peptídica (Tracy y Gregory 1964). Un ejemplo exitoso de esta aproximación experimental, es el hallazgo del neuropéptido Y (NPY) aislado y caracterizado en extractos de cerebro y tejidos endocrinos (Tatemoto, 1982) el cual contiene una tirosina-amida (-X-Tir-CO-NH<sub>2</sub>) en el extremo carboxilo terminal del péptido.

**d). Tecnología de espectrometría de masas.-** En forma paralela a las metodologías empleadas para la búsqueda, identificación y caracterización de péptidos bioactivos, es la *técnica de espectrometría de masas*, recientemente desarrollada y usada para caracterizar el proteoma de múltiples células eucarióticas en mamíferos y humanos (Husi & Grant, 2001). Esta técnica ha venido a complementar y ayudar en forma muy importante los métodos tradicionales de clonación peptídica. Por ejemplo, el acoplamiento de metodologías químicas clásicas de aislamiento peptídico con la tecnología de la espectrometría de masas, LC-MS/MS, ha facilitado la identificación y caracterización estructural de nuevos péptidos localizados en el tejido glandular pancreático de ratón (Ramström y col., 2003) así como, la identificación de ocho péptidos nuevos extraídos de muestras de saliva humana (Vitorino y col., 2004) y la identificación de nuevos neuropéptidos localizados en regiones hipotálamicas del cerebro de la rata y que poseen una estrecha homología estructural con la familia de péptidos de la RF-amida, identificados en moluscos invertebrados (Ukena y col., 2002).

**e).- Anticuerpos policlonales y monoclonales empleados para identificar, aislar y caracterizar la estructura de péptidos bioactivos.-** En adición, una herramienta metodológica ampliamente utilizada en la identificación y caracterización química y molecular de péptidos neuromodulares en el SNC, es el empleo de anticuerpos policlonales o monoclonales generados contra determinantes antigénicos específicos presentes en la secuencia primaria de aminoácidos de múltiples péptidos neuroactivos (Harlow & Lane, 1999; Payne y col., 1988) (ver sección de material y métodos). En este contexto, una amplia variedad de estrategias experimentales han sido desarrolladas basadas en el empleo y monitoreo de anticuerpos, como son las

técnicas de inmunohistoquímica (Harlow & Lane, 1999; Cuello, 1993); comúnmente empleadas para explorar y determinar la localización celular y subcelular del material inmunoreactivo en muestras tisulares y/o celulares; así como, las metodologías de radioinmunoensayo (en fase sólida o líquida) e inmunoblot-dot (Harlow & Lane, 1999; Hockfield y col., 1993) las cuales permiten la identificación y/o cuantificación de material inmunoreactivo peptídico, aislado de extractos tisulares. Asimismo, la aplicación de anticuerpos específicos generados contra determinantes antigénicos específicos en un péptido endógeno bioactivo o un péptido sintético no funcional, en ensayos inmunocromatográficos de exclusión en gel y/o cromatografía de alta presión (HPLC) acoplados a técnicas de radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés) (Glick & Pasternak, 1998; Cortese y col., 1996; Payne y col., 1988) ha permitido identificar, aislar y caracterizar la estructura molecular de una gran cantidad de péptidos neuroactivos, como es el caso de los péptidos opioides dinorfinas y amidorfina, cuya identificación inicial en el SNC de mamíferos se logró, a partir de anticuerpos generados contra las secuencias peptídicas de las encefalinas (Liston y cols, 1983; Evans y cols, 1985).

**f).- Estrategias inmunomoleculares empleadas en la identificación y caracterización estructural de péptidos bioactivos.-** En extensión a lo descrito en el inciso anterior, diversos estudios han mostrado la capacidad y factibilidad de emplear anticuerpos policlonales y/o monoclonales (generados contra determinantes antigénicos específicos de péptidos bioactivos) en estrategias inmunomoleculares basado en procedimientos de “rastreo antigénico por anticuerpos” de una biblioteca de expresión de ADNc para identificar, aislar y caracterizar estructura molecular de precursores proteicos que codifican péptidos neuroactivos (Kaufman y col., 1984). Este acercamiento experimental de naturaleza inmunomolecular fue empleado y aplicado por nuestro grupo de trabajo con el objetivo de identificar, aislar, clonar y caracterizar los genes (ADNc) que codifican los precursores proteicos de las endomorfina.

## 2.0 GENERALIDADES SOBRE LAS ENDOMORFINAS.

**a).- Identificación y caracterización estructural y funcional de precursores proteicos de la familia de diferentes péptidos opioides en el SNC de mamíferos.-** El descubrimiento de los receptores opioides en el sistema nervioso central (Pert y Snyder, 1973; Terenius, 1973) originó el concepto de la existencia de ligandos opioides endógenos que estimuló una intensa carrera por su identificación, lo cual dio origen al descubrimiento inicial de los dos primeros péptidos opioides endógenos denominados encefalinas [Metionina-encefalina (ME) y Leucina-encefalina (LE)] por Hughes y Kosterlitz (1975). Desde entonces una amplia gama de secuencias peptídicas de naturaleza opioide, han sido identificadas en el sistema nervioso de vertebrados e invertebrados (Salzet y col., 2000; Stefano & Salzet, 1999; Harrison y col., 1994) demostrando que los genes que codifican sus moléculas proteicas precursoras, pueden codificar a su vez, una amplia variedad de secuencias activas de péptidos con funciones no opioides (Noda y col., 1982; Kakidani y col., 1982; Nakanishi y col., 1979; Meunier y col., 1995). Un ejemplo característico de la identificación, clonación y caracterización estructural de productos transcripción genómica –ARNms- que codifican precursores proteicos de péptidos opioides bioactivos, es la *preproencefalina A*, el cual contiene codificado en su secuencia consenso de aminoácidos, cinco copias repetidas del peptido opioide, *metionina-encefalina* (ME) (ver introducción) por una secuencia de *Leu-Encefalina* (LE) (Noda y col., 1982; Gubler y col., 1982; Comb y col., 1982). Asimismo, otros ejemplos característicos de precursores proteicos de la superfamilia de péptidos opioides (ver tabla 1) lo representan los precursores proteicos, *preproopiomelanocortina* (POMC) (Nakanishi y col., 1979), *prepronociceptina/orfanina FQ* (Meunier y col., 1995) y la *preprodinorfina* (Kakidani y col., 1982) todos estos han demostrado su sublocalización en el cromosoma de diferes especies mamíferas, incluyendo el humano (NCBI/GENBANK). En este contexto, diversos estudios moleculares han demostrado que el gen que codifica la *preproopiomelanocortina*, codifica secuencias activas de peptidos con funciones de tipo hormonal o neuroendocrina (Vg.,  $\beta$ -LPH, ACTH,  $\alpha/\beta$ -MSH,  $\beta$ -endorfina) con acciones neurotransmisoras/neuromoduladoras de tipo opioide (Vg.,  $\beta$ -endorfina) y no opioide (Vg.,  $\alpha$ -MSH;  $\chi$ -endorfina) en el SNC de mamíferos (Nakanishi y col., 1979); en tanto que el gen que codifica la *pronociceptina/orfanina FQ* (Meunier y col., 1995) tiene codificado en su secuencia nucleotídica consenso, dos péptidos bioactivos con funciones antagónicas (ver

introducción) como son, el peptido hiperalgésico, *nociceptina/orfanina FQ* y el peptido analgésico, *nocistatina*, respectivamente (Okuda-Ashitaka & Ito, 2000; Okuda-Ashitaka y col., 1998). En adición, estudios de caracterización estructural del gen que codifica el precursor *preprodinorfina*, demostraron que este precursor codifica a su vez, secuencias activas de diferentes péptidos con función opioide, denominados *dinorfinas*, como son; la *dinorfina A<sub>1-17</sub>*, la *dinorfina A<sub>1-8</sub>*, la *dinorfina B*, la  $\alpha$ - y  $\beta$ -neoenorfina (Kakidani y col., 1982).

**b). -Identificación y caracterización farmacológica de subtipos de receptores opioides.-** El estudio de la farmacología de receptores opioides dieron como resultado la identificación, clonación y caracterización estructural y molecular de cuatro subtipos de receptores opioides, acoplados a proteína Gi/Go (GPCR, por sus siglas en inglés) denominados como;  $\mu$ - $\mu$ ,  $\delta$ - $\delta$ ,  $\kappa$ - $\kappa$  y ORL-1 (Mizoguchi y col, 2002); los cuales median los efectos biológicos de diferentes péptidos opioides (Vg., encefalinas, dinorfinas, endorfinas, nociceptina/orfanina FQ) (ver tabla 1 e inciso anterior) en el tejido nervioso, a través de la unión preferencial y activación específica de estos subtipos de receptores opioides, identificados en el cerebro de mamíferos (Smith & Lee, 2003; Mizoguchi y col, 2002).

En este contexto, la aplicación de diferentes ensayos farmacológicos de unión radioligando receptor mostraron que las *encefalinas* (ME, LE) se unen con mayor selectividad y especificidad al receptor opioide  $\delta$  ( $K_i < 1.0$  nM) (Kosterlitz y col., 1989); en tanto que, las dinorfinas poseen una unión preferencial de alta afinidad sobre el receptor opioide  $\kappa$  ( $K_i < 1.0$  nM) (Kosterlitz y col., 1989) y las endorfinas (Vg.,  $\beta$ -endorfina) (Smith & Lee, 2003; Mizoguchi y col, 2002) median sus efectos analgésicos, a través de su unión de baja afinidad ( $K_i \leq 4.5$  nM) (Raynor et al., 1994; Kosterlitz y col., 1989) sobre el receptor opioide  $\mu$  (Smith & Lee, 2003; Mizoguchi y col, 2002).

**c).- Endomorfina como nuevos ligandos peptídicos del receptor opioide  $\mu$ .** Un hallazgo relativamente reciente, que despertó un gran interés en el campo de la neurofarmacología de los opiáceos, está relacionado con la identificación de un nuevo subgrupo de péptidos opioides, denominados como *endomorfina* (EMs) 1 y 2, aislados a partir del cerebro bovino y humano, por el grupo de trabajo del Dr. Zadina (1997). En este contexto, las *endomorfina*, son dos tetrapéptidos amidados en el carboxilo terminal, con las secuencias peptídicas consenso mostradas a

continuación; *endomorfina 1* (EM-1) -YPWF-NH<sub>2</sub>; y la *endomorfina 2* (EM-2) -YPPF-NH<sub>2</sub>. Estos dos nuevos péptidos neuroactivos del SNC de mamíferos mostraron tener la más alta afinidad y selectividad de unión (Vg., K<sub>d</sub> ~ 1.2 nM) por el receptor opioide  $\mu$  (ROM), en relación con la unión mostrada por otros péptidos opioides endógenos sobre este mismo receptor (Hackler y col., 1997; Zadina y col., 1997; Gong y col., 1998), además de mostrar sus capacidades de inhibir significativamente el sistema de señalamiento intracelular dependiente de AMPc, como consecuencia de la activación del receptor opioide  $\mu$  y sus proteínas acopladas, Gi/Go (Hosohata y col., 1998; Gong y col., 1998); así como de inhibir la corriente entrante de calcio a nivel neuronal (Higashida y col., 1998) e incrementar la corriente rectificadora de potasio; dando como resultado, una disminución significativa de la excitabilidad neuronal (Gong y col., 1998). En extensión a estos resultados, diversos estudios celulares han demostrado que estos péptidos; a diferencia de la morfina, inducen una rápida respuesta de internalización del receptor opioide  $\mu$  en células de la línea neuronal-SH-SY5Y (Horner & Zadina, 2004).

Estos estudios dieron lugar a la investigación y demostración subsiguiente, de que ambas EMs se distribuyen ampliamente en diversas regiones cerebrales en el cerebro de mamíferos (Vg., ratón y rata) (Zadina, 2000; Martín-Schild y col., 1999; B. B. Antón y col., 1998) y humano (Sánchez-Islas y col., 2002); mostrando una distribución asimétrica de sus respectivas inmunoreactividades (IR-EM-1, IR-EM-2) (Wang y col., 2003; Zadina, 2000); además de mostrar su colocalización regional y celular en terminales nerviosas con neuronas que expresan el receptor opioide  $\mu$ , la sustancia P, el péptido CGRP [calcitonin gene-related peptide por sus siglas en inglés], el neurotransmisor inhibitorio GABA (Greenwell y col., 2007; Silverman y col., 2005; Aicher y col., 2003, Abbadie y col., 2002); además de mostrar que las EMs reproducen las acciones fisiológicas, farmacológicas y conductuales de los alcaloides opiáceos (Fichna y col., 2007; Zadina, 2000; Zadina y col., 1999).

En este contexto, estos estudios han demostrado que las EMs inducen una potente actividad analgésica posterior a su inyección ICV o IT en ratones (Zadina y col., 1997) así como, respuestas anti-alodínicas en modelos animales de dolor crónico (Sakurada y col., 2002; Soignier y col., 2000; Huang y col., 2000; Przelowcka y col., 1999) en adición, a respuestas alimentarias y de apetito; respuestas ventilatorias (Czapla & Zadina, 2005) y consumo de oxígeno (Asakawa y col., 1998); respuestas vasodepresoras y cardiorrespiratorias (Wang y col., 2007; Champion y col., 2002;

Czapla y col., 2000; Kwok and Dun, 1998); respuestas aórticas reflejas de baroreceptores (Kasamatsu y col., 2005); respuestas espinales reflejas polisinápticas (Tao y col., 2005); respuestas de motilidad gastrointestinal (Yu y col., 2007; XXX); respuestas de modulación neuroendocrina (Bujdoso y col., 2003; Coventry y col., 2001; Doi y col., 2001) e inmune (Azuma y col., 2002) respuestas antidepresivas en modelos animales de estrés crónico (Fichna y col., 2007), alteración conductual de aprendizaje y memoria (Ukai et al, 2001).

Sin embargo, a pesar del hecho, de que las EMs han sido propuestas como los ligandos peptídicos endógenos-agonistas del receptor opioide  $\mu$  y producen respuestas fisiológicas y farmacológicas relevantes en el SNC y tejidos extraneurales, a la fecha actual no existe estudios o reportes científicos que demuestren la identificación y caracterización estructural de precursores proteicos que codifican estos dos nuevos tetrapéptidos, aislados del SNC de mamíferos. Por lo tanto, bajo la premisa de que las EMs son moléculas bioactivos importantes para el desarrollo de múltiples funciones vitales (Vg., analgesia y antinocicepción) y relevantes para la sobrevivencia de un organismo; resulta entonces imperiosa la necesidad de definir el origen bio sintético endógeno de estas moléculas, mediante la identificación, aislamiento y caracterización molecular y estructural de uno o más precursores proteicos que codifiquen secuencias activas de las endomorfina 1 y 2. De lograrse esta situación, entonces se podría aseverar el origen biosintético-endógeno de estos dos nuevos péptidos bioactivos de naturaleza opioide en el SNC de los mamíferos. En este contexto, es en función de esta última necesidad experimental, la cual se centró el objetivo experimental global del presente trabajo de mi tesis, como se detalla mas adelante, en la sección del "Planteamiento y Justificación del trabajo experimental".

**III. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES PRELIMINARES DE LA TESIS**

El objetivo experimental y el abordaje metodológico empleado para el desarrollo del trabajo experimental de la presente tesis doctoral, requirieron de la disponibilidad de antisueros específicos contra las secuencias peptídicas de las *endomorfina 1 y 2*, purificados por afinidad de antígeno y denominados *C-14 APAA* y *C-16 APAA*, respectivamente; así como de la demostración experimental de reconocer material inmunoreactivo a estos dos péptidos en material proteico de alta masa molecular. En función de estos requisitos experimentales, es justificado mostrar como antecedentes preliminares del proyecto de tesis, la generación exitosa de ambos anticuerpos con estas capacidades funcionales probadas, generadas por el grupo de trabajo del laboratorio del Dr. B. Antón han sido reportadas en la revista *MethodsFinder Abstract Citation* (B. Antón y col., 2000) y presentado en foros y congresos internacionales (B. Antón y col., 1998; 2002).

En este contexto, los antisueros policlonales de conejo generados contra las secuencias consenso de las EM-1 y 2, purificados por afinidad de antígeno, mostraron una alta especificidad y selectividad de reconocimiento inmunológico por las secuencias sintéticas de las EM-1 Y EM-2 en ensayos de ELISA competitivo, empleados inicialmente para evaluar la especificidad de los antisueros productivos (B. Antón y col., 2000). Estos ensayos mostraron que el antisuero *C-14 APAA* mostró una especificidad de reconocimiento para la EM-1, en tanto que el antisuero *C-16 APAA* mostro una selectividad preferencial para la EM-2. Mas aun, el antisuero *C-14 APAA* mostro un entrecruzamiento inmunoreactivo del 30% hacia el péptido hoomologo de la EM-2; en tanto que el antisuero *C-16 APAA* mostró un entrecruzamiento del 20% hacia la EM-1. Asimismo, ambos antisueros no mostraron ningún entrecruzamiento inmunoreactivo hacia mismos péptidos antigénicos competidores, incluyendo; la  $\beta$ -endorfina y la dinorfina  $A_{1-17}$  (ver sección de métodos) en el rango de concentraciones empleados de: 1-100 pM, 1-100 nM y 1-100  $\mu$ M (resultados no mostrados). Adicionalmente, se implementaron ensayos de inmunoblot-dot y de radioinmunoanálisis competitivos en fase sólida (RIA) (Hockfield y col., 1993) con el objetivo de identificar el posible reconocimiento cruzado de los antisueros productivos anti-EMs contra péptidos opioides y no opioides endógenos con homología estructural a las secuencias consenso codificadas por las EMs y en este contexto, validar la especificidad y selectividad de ambos antisueros para su empleo en la estrategia inmunomolecular de “rastreo antigenico por anticuerpos” para

detectar clones de transformantes bacterianas inmunopositivas como se detalla mas adelante. Los resultados obtenidos de estos ensayos inmunologicos se describen brevemente en los incisos feriores, ejemplos representativos de estos se ilustran en las figuras 1 y 2.

1.- Ensayos de immunoblot-dot.- Estos ensayos emplearon peptidos competidores opioides y no opioides del tipo de la Leu-encefalina (YGGFL-OH), Met-encefalina (YGGFM-OH), Tir-W-MIF-1 (YPWG-NH<sub>2</sub>) y la sustancia P (RPKQQFFGLM-NH<sub>2</sub>), respectivamente (véase Figura 1-A) en concentraciones de  $2 \times 10^{-9}$ - $2 \times 10^{-14}$  M. Los resultados de estos ensayos mostraron que ambos antisueros fueron capaces de reconocer los peptidos ortologos de las EM1-2, en las concentraciones empleadas, y asimismo de mostrar reconocimientos inmunológicos cruzados contra ambas secuencias de las EMs, como se ilustra para el antisuero para EM-1 (C-14 APAA), el cual mostró una reacción de entrecruzamiento contra la secuencia peptídica de la EM-2 (figura 1B) en rangos de concentración de  $2 \times 10^{-9}$ - $10^{-12}$  M; en tanto que el antisuero preferencial de la EM-2 (C-16 APAA) mostró un entrecruzamiento inmunoreactivo contra la EM-1, en mismo rango de concentraciones (figura 1C). Como se aprecia en ambas figuras, ambos antisueros mostraron una completa ausencia de reconocimiento inmunológico cruzado contra los péptidos opioides y no opioides estructuralmente relacionados a las EMs en las concentraciones ensayadas.

2.- Radioinmunoensayo (RIA) en fase sólida.- Para complementar la validación de la especificidad de los antisueros anti-EMs se implementaron y aplicaron ensayos estándares de radioinmunoensayo (RIA) (Hockfield y col., 1993). Estos estudios mostraron la capacidad de ambos antisueros en detectar con alta especificidad y selectividad los péptidos sintéticos de las EM1-2. Un ejemplo representativo de un ensayo de RIA que empleo el antisuero preferencial para EM-1 (C-14 APAA) y el trazador radioactivo de la EM-1 (<sup>125</sup>I-endorfina-1) se ilustra en la figura 2. Esta figura muestra que el antisuero C-14 APAA fue capaz de detectar la EM-1 en un rango de concentración tan baja de  $40 \pm 5$  fmol/pozo con respecto al valor de referencia de la IC<sub>50</sub>. Asimismo, esta figura muestra que el valor más pequeño detectable de desplazamiento del péptido sintético de la EM-1 al valor del IC<sub>20</sub>, fue de  $15 \pm 5$  fmol/pozo, mostrando adicionalmente, una reacción de entrecruzamiento relativo del antisuero C-14 APAA por la EM-2 de  $13 \pm 5\%$  al valor de referencia de IC<sub>50</sub>. Mismos resultados fueron obtenidos con el antisuero para EM-2 (C-16 APAA) detectandose un reconocimiento cruzado relativo hacia la EM-1  $10 \pm$



## **ANTECEDENTES EXPERIMENTALES S**

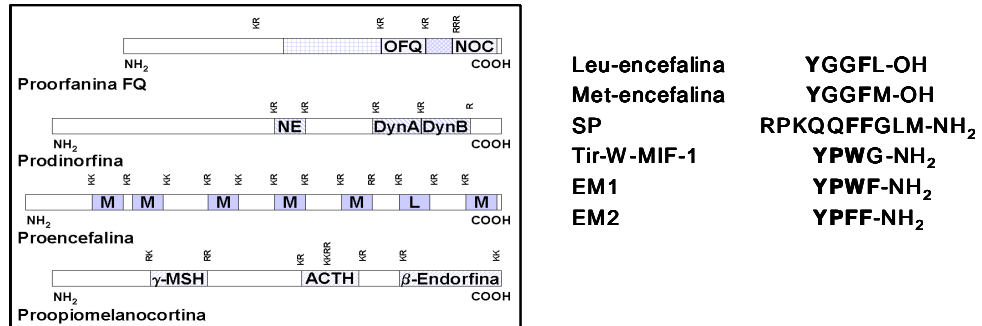
---

6 % al valor de referencia de IC<sub>50</sub> (datos no mostrados). Más aun, como se aprecia en la figura, este antisuero productivo C-14 APAA (al igual que el antisuero C-16 APAA) mostro una ausencia significativa de reactividad cruzada por los péptidos estructuralmente relacionados a las EMs (empleados en los ensayos de inmunoblot-dot) en los rangos de concentraciones de péptidos competidores ensayadas (0.1-1000 fmol, 1-100pmol y 1-100 nmol).

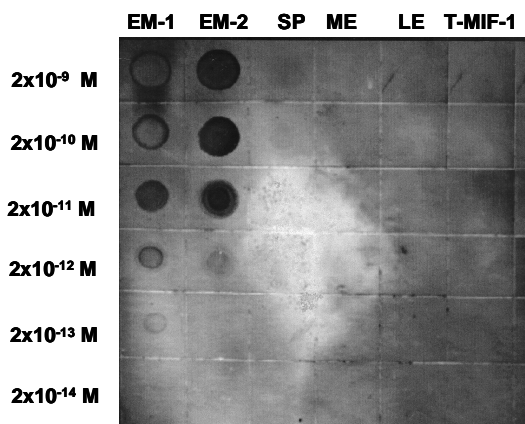
Una vez validada la especificidad y selectividad de nuestros antisueros C-14 APAA y C-16 APAA contra las secuencias de las EMs sintéticas, el grupo del Dr. B. Antón, en colaboración con el Dr. Segovia (CINVESTAV) evaluaron la capacidad de ambos antisueros para detectar material IR-EM1-2 en componentes proteicos de alta masa molecular en ensayos estándares de Western- Blot (Hockfield y col., 1993). Estos estudios mostraron la capacidad de ambos antisueros productivos anti-EM-1/EM-2, de converger en la detección de material IR-EM1-2 en especies proteicas de alta masa molecular (vg., 70 y 62 kDa) expresados asimétricamente en tejidos de distintas áreas neurales y órganos periféricos de la rata (datos no mostrados).

Estas capacidades funcionales mostradas en diferentes ensayos por ambos antisueros, proporcionaron su empleo ulterior en procedimientos de inmunodetección de una biblioteca de expresión de ADNc transfectada en el sistema de expresión celular bacteriano de la E. coli, como método de abordaje para identificar y clonar los gen(es) que codifican el o los precursor(es) de las EM1-2.

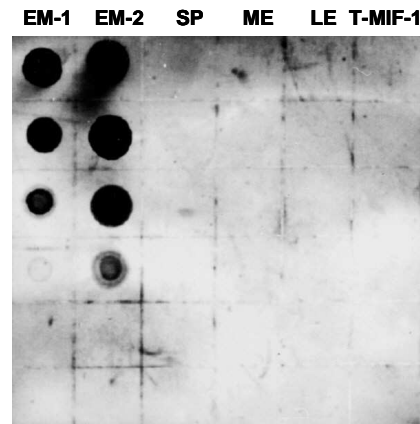
**A**



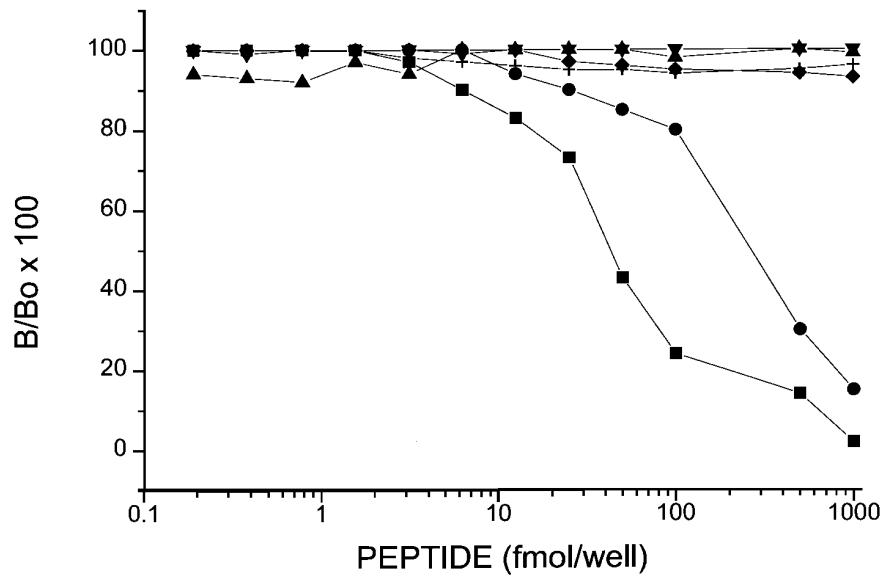
**B**



**C**



**Figura 1.- (A).** Representación gráfica de las cuatro moléculas proteicas precursoras de los péptidos opioides conocidos y la secuencia de aminoácidos de los péptidos estructuralmente análogos a las EMs, utilizados para la validar la especificidad de los anticuerpos C-14 AAPA/C-16 AAPA. Los aminoácidos comunes se identifican con letra obscura. **(B-C).** Ensayos de Inmunoblot-dot empleados para validar la especificidad de los antisueros policlonales de conejo para EM-1 (C-14 APAA) **(B)** y para EM-2 (C-16 APAA) **(C)** contra péptidos antigénicos estructuralmente análogos: EM-1, EM-2; péptidos opioides; ME, LE, Tir-W-MIF-1; péptidos no opioides; SP (ver texto).



**Figura 2. Radioinmunoensayo (RIA) prototipo para EM-1.-** La figura muestra la especificidad inmunoreactiva del antisuero policlonal generado contra la EM-1 (C-14 AAPA) en detectar la EM-1 y por reactividad cruzada la EM-2, mostrando un valor de entrecruzamiento para la EM-2 de  $13 \pm 5 \%$ , al valor de referencia de  $IC_{50}$ .

**Símbolos:** EM-1: ■; EM-2: ●; LE: ▲; ME: ▼; SP: ★ Tir-W-MIF-1: ◆

---

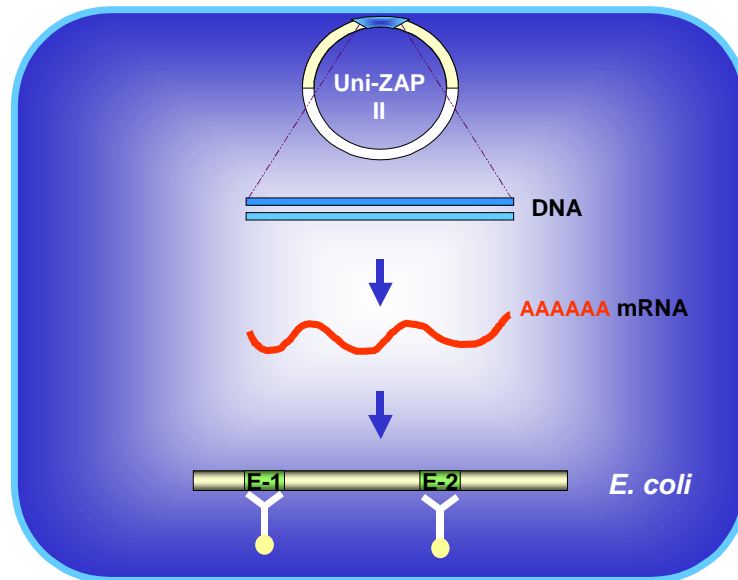
**IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA EXPERIMENTAL Y JUSTIFICACION DEL TRABAJO DE TESIS**

Desde el descubrimiento de las endomorfina, postulados como los ligandos peptídico endógenos agonistas del receptor opioide  $\mu$ , que producen potentes efectos analgésicos y anti-alodínicos, además de la amplia variedad de efectos farmacológicos, fisiológicos y conductuales en el SNC, a la fecha actual, no existen reportes científicos que documenten, la clonación y/o caracterización molecular y/o estructural de uno o más precursores proteicos polipeptídicos que codifiquen estos dos péptidos opioides en el cerebro de los mamíferos. En este contexto, resulta de extrema importancia definir estrategias experimentales que permitan lograr la identificación, aislamiento, clonación y caracterización molecular de gen o genes que codifiquen uno o más precursores proteicos con las secuencias consenso de las endomorfina. El logro de este hallazgo molecular, permitiría entonces, asegurar el origen biosintético neural de estas péptidos, apoyando su papel, como agentes neuroactivos endógenos y moduladores del sistema de transmisión opioide en el SNC. Mas aun, es factible proponer el hallazgo de *nuevas secuencias peptídicas* codificadas en el o los precursores identificados, cuya caracterización estructural permitiría elucidar posibles nuevos sistemas de transmisión de naturaleza peptídico (ligando-receptor). Ejemplos claros de estos hallazgos, es el caso del precursor proteico del sistema peptídico *nociceptina/orfanina FQ* y su receptor opioide, *ORL-1* (ver detalles en la sección de introducción).

Por lo tanto, las metodologías experimentales empleadas para identificar, clonar y caracterizar genes o ARNm que codifican secuencias consenso de péptidos bioactivos con funciones opioides y no opioides, condensadas en precursores proteicos polipeptídicos (ver NCBI/GENBANK e introducción) resultan fundamentales para desarrollar, estandarizar y aplicar la estrategia inmunomolecular de “rastreo antigénico por anticuerpos” empleadas en el trabajo de tesis, con el objetivo de clonar y caracterizar nuevos ARNm que codifican las secuencias peptídicas consenso de las endomorfina 1 y 2, y/o secuencias peptídicas tipo endomorfina, condensadas en precursores proteicos polipeptídicos o productos proteicos biosintéticos. El hallazgo de este ultimo, esto es, la identificación, clonación y caracterización estructural de secuencias peptídicas tipo endomorfina codificadas en productos proteicos biosintéticos es lo que diocomo resultado el avance y logro de los resultados del trabajo experimental de esta tesis.

**V. HIPÓTESIS GENERAL DE TRABAJO EXPERIMENTAL**

Probada la capacidad funcional de los antisueros generados contra las secuencias peptídicas de las EMs 1-2, purificados por afinidad de antígeno, C-14 APAA y C-16 APAA, respectivamente, la hipótesis de trabajo experimental estuvo dirigida a aplicar los antisueros productivos como reactivos inmunológicos para implementar, estandarizar y desarrollar una estrategia inmunomolecular de “rastreo antigénico por anticuerpos” que permita la identificación, aislamiento y caracterización molecular del gen o genes que codifiquen secuencias peptídicas consenso de las EM1-2, codificadas en un precursor o precursores polipeptídicos (véase figura 3). En adición, existe la posibilidad de identificar nuevas secuencias peptídicas con homología estructural similar o disimilar a las secuencias peptídicas de las EMs, condensadas en el mismo precursor proteico de las EMs. Bajo esta premisa, fue diseñado y abordado los objetivos experimentales descritos en el trabajo de tesis.



**Figura 3. Esquema representativo que ilustra la hipótesis de la estrategia inmunomolecular propuesta y empleada para identificar los precursores proteicos de las endomorfinas 1-2.** Esta figura muestra el diseño y aplicación de nuestra estrategia inmunomolecular propuesta y empleada. El diseño de esta estrategia, tiene contemplado la transfección de una biblioteca viral de expresión de ADNc (Vg., sistema vector UNIZAP II) en el sistema celular de la E. Coli. En el supuesto caso de contener subclonado el inserto de ADNc que codifica material IR-EM1-2, el transcrito de ARNm y su producto proteico de expresión, que contiene codificado las secuencias peptídicas de las EMs, podrían ser detectadas por nuestros anticuerpos policlonales anti-EM-1 (C-14-APAA) y anti-EM-2 (C-16-APAA) a través del empleo del método de detección de “rastreo antigénico por anticuerpos” e identificadas en nuestros ensayos inmunomoleculares, como una *señal de detección inmunopositiva*. La identificación de la clona que contiene el ARNm que codifica material IR-EM1-2, sería aislado, amplificado y caracterizado molecularmente, para finalmente determinar la estructura del ARNm codificante de las secuencias peptídicas consenso de las EMs 1-2, en adición de otras posibles nuevas secuencias peptídicas, condensadas en el mismo precursor polipeptídico, que originó la señal inmunopositiva.

**VI. OBJETIVOS EXPERIMENTALES**

**GENERALES.**

- ◆ Diseño, desarrollo y aplicación de una estrategia inmunomolecular para identificar, aislar, clonar y caracterizar la estructura molecular de un gen o genes que codifican las secuencias consenso de las EM1-2 en uno o mas precursores proteicos polipeptídicos, en adición de la identificación de posibles nuevas secuencias peptídicas codificadas, con actividades biológicas aun desconocidas (véase figura 3).

**PARTICULARES**

- ◆ Implementación y aplicación de metodologías estándares de transfección y amplificación de un banco de expresión de ADNc del cerebro total de ratón adulto (*Mus musculus*, BALB/c, whole brain; Stratagene) para transformar células bacterianas de la cepa, *E. coli* XL1-Blue MRF', mediante la inoculación de títulos con el sistema viral de transfección UNIZAP II (Stratagene) (figura 4).
- ◆ Implementación y aplicación de metodologías estándares de crecimiento de transformantes bacterianos en medios de cultivo sólido enriquecidos [(Agar-NZY; formación de placas líticas y transferencia de material lítico a membranas de nitrocelulosa (figura 5)].
- ◆ Implementación y aplicación de metodologías de inmunoblot-dot para detectar por "rastreo antigénico por anticuerpos" material IR-EM1-2 formando parte de componentes proteicos de alta masa molecular en placas líticas de transformantes bacterianas, mediante la aplicación de los anticuerpos primarios de las EM1-2 (C-14 APAA; C-16 APAA).
- ◆ Implementación y aplicación de técnicas de exposición autoradiográfica para detectar con alta sensibilidad, las señales positivas IR-EM1-2 en el material lítico de transformantes bacterianas, mediante la aplicación e incubación de anticuerpos secundarios radioactivos (Vg., <sup>125</sup>I-Goat antirabbit IgG)

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

---

- ◆ Implementación y aplicación de metodologías de aislamiento, amplificación, purificación de plásmidos vectores (pBluescript S/K ±) (Stratagene) y sus insertos de ADNc en clonas identificadas inmunopositivas.
- ◆ Implementación y aplicación de ensayos metodológicos de análisis de restricción y amplificación por PCR para caracterizar los tamaños moleculares de los insertos de ADNc de las clonas identificadas inmunopositivas.
- ◆ Implementación y aplicación de técnicas y métodos estándares de secuenciación nucleotídica automatizada por capilar de los insertos de ADNc de clonas identificadas inmunopositivas, para determinar la identidad molecular de los ARNm clonados como sus productos proteicos de traducción deduccional, en adición de los estudios de análisis comparativo de homología estructural de los ARNm identificados, mediante el empleo de softwares especializados del NCBI/GENBANK.



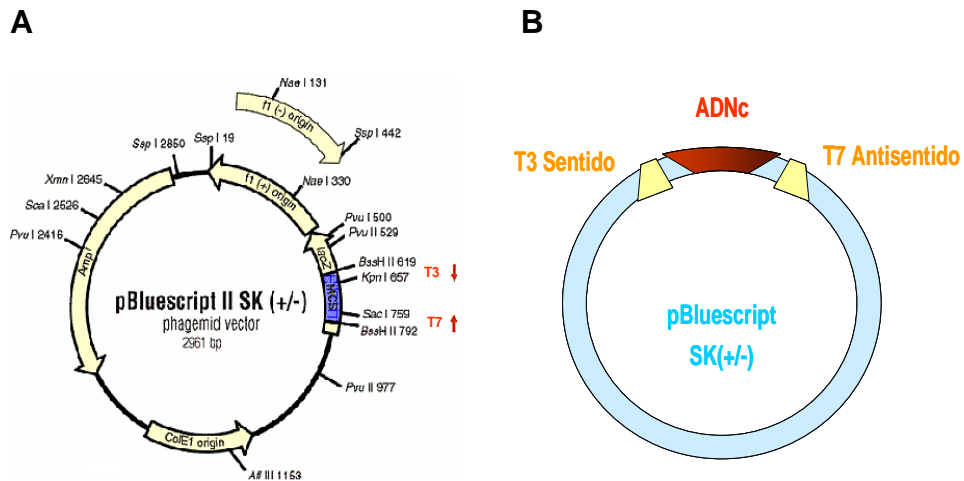
---

**VII. MATERIAL Y METODOS**

**1. Procedimientos inmunomoleculares para identificar y caracterizar insertos de ADNc que codifican los precursores proteicos de las EM1-2 en transformantes bacterianas.-** Uno de los objetivos centrales del proyecto de tesis estuvo centrado en el diseño, implementación y aplicación de una estrategia inmunomolecular para rastrear material IR- EM1-2 en productos proteicos de alta masa molecular expresadas en transformantes bacterianas previamente transfectadas con una biblioteca de ácido deoxirribonucleico complementario (ADNc) del cerebro total del roedor (ratón). Esta estrategia inmunomolecular fue diseñada y empleada para identificar y aislar clonas inmunopositivas que pudiesen expresar ARNms específicos (codificantes de los precursores proteicos polipeptídicos de las EMs) y que poseen una muy baja representatividad (<0.5%; < 0.1-0.2 copias/célula) dentro de una población heterogénea del ARNm total en un célula neuronal (Sambrook & Russell 2001).

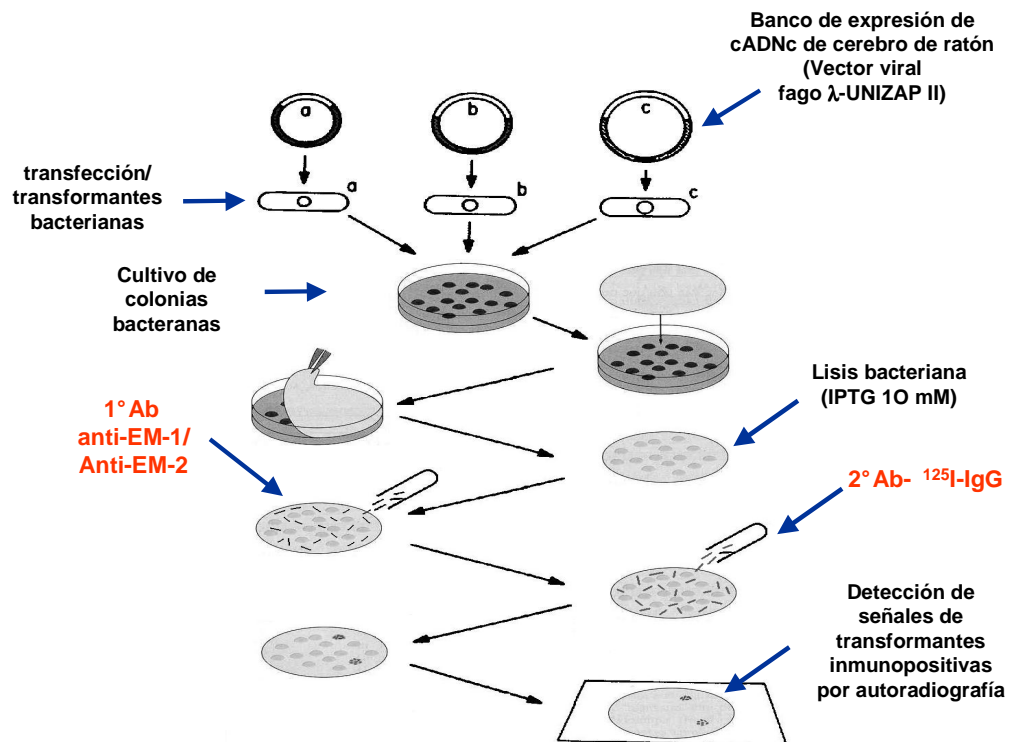
a).- Procedimientos moleculares de transfección y amplificación de un banco de expresión de ADNc del cerebro total de ratón.- Esta metodología empleó un banco de expresión comercial de ADNc del cerebro total del ratón adulto (*Mus musculus*, BALB/c, whole brain, Stratagene, Cat. 937319) no solamente por su capacidad de infectar y transformar sistemas celulares bacterianos de la cepa XL1-Blue MRF' de la *E. coli*, sino por el hecho de que los insertos de ADNc ( $\cong 1.8$  Kb; > 80%) clonados en el sistema plasmídico *pBlueScript SK (+/-)* y subclonado en sistema del vector viral de infección, el fago lamda *UNI-ZAP-XR*, poseen una orientación en sentido 5'-3'; lo que hace factible la transcripción de ARNms sentido y la expresión de secuencias polipeptídicas con marcos de lectura abierta funcionales (véase figura 4). Bajo estos parámetros, este sistema vector de clonación de ADNc fue adquirido y empleado para llevar a cabo los métodos de transfección, lisis bacteriana titulación y amplificación de la biblioteca siguiendo procedimientos estándares recomendados por el fabricante (Stratagene) y descritos por Sambrook & Russell (2001) empleando la cepa bacteriana, XL1-Blue MRF' de *E. coli*. En forma breve, un tamaño de banco de expresión de ADNc  $\approx 6.5 \times 10^5$  unidades formadoras de placa (pfu, por sus siglas en inglés) fue empleado para transfectar bacterias de la cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' a una OD<sub>560</sub> de 0.5. La amplificación del banco de

ADNc se llevo a cabo mediante la exposición de las transformantes bacterianas a crecimiento a confluencia en un medio de cultivo sólido Agar-NZY a 40°C/ 4 hrs.



**Figura 4.- Representación gráfica del vector de expresión bacteriano pBluescript SK (+/-).** Las flechas en rojo a la derecha muestran la posición en el vector de los sitios de restricción de clonación de la biblioteca de los insectos ADNc's clonados en el vector viral (UNIZAP II) incluyendo los sitios promotores de transcripción T3 y T7 por polimerasas. (B) Representación gráfica del vector de expresión bacteriano pBluescript SK (+/-) conteniendo los sitios promotores de transcripción T3 (sentido) y T7 (antisentido).

b).- Lisis bacteriana y ensayos de inmunoblot-dot.- La transformantes fueron expuestas a lisis bacteriana en presencia de una solución de 10 mM de IPTG (Gibco BRL) previamente embebida en filtros de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore) y colocadas por aposición sobre la fase sólida de agar e incubadas a 37°C/ 4hr, para facilitar la transferencia y adsorción del material lítico resultante al soporte sólido de las membranas (véase figura 5). El material lisado de las placas líticas, adsorbidas a las membranas de nitrocelulosa fueron retirados cuidadosamente de las placas de cultivo y lavados en una solución de PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)/10 minutos a TA para eliminar residuos de material de cultivo adheridos a los filtros. La detección de material IR-EM1-2 en placas líticas de transformantes bacterianas se llevo a cabo mediante la aplicación de la técnica estándar de inmunoblot-dot (Hockfield y col., 1993). Dos juegos de filtros fueron separados (n=30 c/u) e incubados a 4°C/12 hrs, en presencia del antisuero C-14 APAA ó del antisuero C-16 APAA, diluidos 1:40 y 1:20, respectivamente, en una solución de bloqueo [PBS (pH 7.4) /5% de leche descremada (non fat dry milk) /0.3% Tween-20 (SIGMA)]. Los filtros fueron posteriormente expuestos a un periodo de cinco lavados (lavado/10 min) en la solución de bloqueo, para eliminar el exceso de antisueros adheridos inespecíficamente a las membranas. La detección de señales inmunopositivas se realizó mediante el empleo de la técnica de autoradiografía (Hockfield y col., 1993) y la aplicación de un anticuerpo secundario IgG de conejo marcado con Yodo-125 (<sup>125</sup>I-IgG; Jackson ImmunoResearch Lab) diluido 1:5000, en una solución de PBS (pH 7.4)/0.3% Tween-20. Las partículas fágicas conteniendo los insertos de ADNc de las clonas identificadas y que originaron la señal inmunopositiva, fueron recolectadas de las macroplacas líticas del medio de cultivo ( $\approx$  0.5 cm); resuspendidas en una solución de medio de Agar NZY/5% de cloroformo y congelados a -20°C hasta su uso ulterior en una sub siguiente ciclo de subclonación. Este ciclo de subclonación empleo un título máximo de 200 pfu's para transfectar la cepa bacteriana, XL1-Blue MRF' de la E. Coli, para verificar la individualidad de las señales inmunopositivas detectadas previamente. Los fagos recuperados de las macroplacas individuales fueron amplificados, expuestos a procedimientos de escisión *in vivo* y purificación del plásmido vector/inserto de ADNc que originó las señales inmunopositivas.



**Figura 5. Esquema de la estrategia inmunomolecular empleada para la identificación, aislamiento y clonación de transformantes bacterianas inmunopositivas.** Posterior a la transfección de un banco de expresión ADNc de cerebro total de ratón en el sistema celular procariotica de la E.Coli, las bacterias transformadas fueron expuestas a crecimiento hasta su confluencia en colonias bacterianas, induciendo la lisis bacteriana mediante la aposición de filtros de nitrocelulosa, embebidos previamente con IPTG (10 mM). La detección de la expresión de material IR-EM1-2 en productos proteicos de alta masa molecular, transferido y adsorbido a filtros de nitrocelulosa, fue evaluado mediante ensayos de inmunoblot-dot, empleando nuestros antisueros C-14 APAA y C-16 APAA, en adición de un anticuerpo secundario de conejo <sup>125</sup>I-IgG empleado para detectar las señales inmunopositivas de colonias de transformantes bacterianas.

c).- Amplificación y purificación de plásmidos vectores.- Los insertos de ADNc en los plásmidos vectores de las clonas identificadas fueron aisladas y amplificadas, con el objetivo de escindir *in vivo* el componente plásmidico (pBluescript S/K  $\pm$ ) del fago lamda UNIZAP-XR, empleando el sistema viral del fago ExAssist (Stratagene, 2001) siguiendo los procedimientos estándares sugeridos por el fabricante (Stratagene). El plásmido vector con su inserto ADNc candidato, fue expuesto a un ciclo de amplificación, mediante la transfección plásmidica del sistema celular bacteriano SOLR de la E.coli (Stratagene) e incubación de las transformantes resultantes en un medio sólido agar/LB a 37°C/12-16 hrs (Sambrook & Russell, 2001). Los plásmidos vectores fueron aislados y purificados por métodos estándares de purificación de ADN plásmidico, mediante el empleo de columnas de intercambio iónico "Miniprep" de QIAGEN (QIAPrep Spin Miniprep, Cat. 27106). Los plásmidos purificados de las clonas inmunopositivas, fueron expuestos a análisis de restricción y amplificación por PCR para determinar los tamaños moleculares de los insertos de ADNc candidatos.

d).- Análisis de restricción de los insertos de ADNc de la clonas candidatas identificadas.- Esta metodología fue empleada para caracterizar la identidad y el tamaño molecular de los insertos de ADNc clonados en el plasmido vector [pBluescript S/K ( $\pm$ )] purificado y aislado de las transformantes inmunopositivas mediante procedimientos estándares de electroforesis en geles de agar, siguiendo las metodologías previamente descritas por Sambrook & Russell (2001). Los ensayos de restricción enzimática se llevaron a cabo mediante el tratamiento del ADN plasmidico con endonucleasas del tipo, EcoR I y Xho I (enzimas de restricción que reconocen sitios consenso de corte en el ADN plasmídico que flanquean los sitios de clonación de los insertos de ADNc candidatos, en los extremos 5' y 3', respectivamente). En forma breve, un volumen total de reacción de 20  $\mu$ l conteniendo 1U de cada nucleasa, EcoR I y Xho I (Gibco BRL)/ $\mu$ g de ADN plasmídico fue expuesto a incubación a 37°C/ 1 hr en un bloque térmico, Multi-Block Heater (Lab-Line). Los productos de restricción fueron cargados (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l de DNA amplificado/carril) a geles de 1% de azarosa

(Gibco BRL) y detectados en un analizador de imágenes (Image Station Kodak 440-CF) mediante estimulación de luz una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 490 nm.

e).- Amplificación de los insertos de ADNc de clonas identificadas por técnicas estándares de PCR.- En forma paralela a los ensayos de restricción enzimática, se llevaron a cabo bajo procedimientos estándares de amplificación de los insertos de ADNc por el método de reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para verificar el tamaño molecular de los mismos, empleando cebadores (primers, por sus siglas en inglés) complementarios a las sitios consenso de iniciación de transcripción T3-T7, siguiendo las condiciones y fases experimentales de temperatura, desnaturalización del plásmido, síntesis y amplificación de ADN, descritas previamente por Sambrook & Russell, 2001 y Glick & Pasternak, 1998, como se detalla en la figura 6. En forma breve, los plásmidos con los insertos de ADNc candidatos fueron mezclados en una solución de amplificación en presencia de Taq DNA polimerasa (Gibco BRL)/deoxiribonucleosidos trifosfatos [dNTPs] (Gibco BRL)/ oligonucleótidos complementarios a los sitios de transcripción T3-T7 y sujetos a 25 ciclos de amplificación por PCR (ciclo/5 min), en un termociclador automatizado de PCR (Eppendorf). Los productos de amplificación por PCR fueron cargados (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de DNA amplificado/carril) a geles de 1% de agarosa (Gibco BRL) y detectados en un analizador de imágenes (Image Station Kodak 440-CF) mediante estimulación a una  $\lambda$ 490 nm.

Hdl	3Tm	25 fold	Ext
96°	96°	65°	72°
1:00	0:30	5:00	7:00
	49°		4.0
	0:30		ω

Temp (°C)

Tiempo (min)

**Figura 6. Condiciones experimentales del método de amplificación por PCR.** El recuadro muestra los ciclos requeridos para llevar a cabo la amplificación de los insertos de ADNc de las clonas identificadas (Eppendorff termocycler) empleando los oligonucleótidos complementarios T3 y T7 (ver texto). Los plásmidos con los insertos de ADNc candidatos, son mezclados en presencia de Taq DNA polimerasa, deoxiribonucleosidos trifosfatos [dNTPs] y los oligonucleótidos complementarios a los sitios de transcripción T3/T7, para ser posteriormente sujetos a ciclos de amplificación por PCR. Como se muestra en la figura este proceso incluye las siguientes etapas de amplificación: 1.- (Hdl) denaturalización de las cadenas de ADN del plasmido a 96°C/1 min. 2.- Ciclo de desnaturalización en presencia de exceso de T3 y T7 a 96°C/30 seg (3Tm). 3.- Enfriamiento gradual a 49°C/ 30 seg para favorecer el apareamiento de los oligonucleótidos T3/T7 con los sitios promotores de transcripción clonados en el plasmido vector purificado. 4.- Síntesis de ADN a temperatura de 65°C, repetición de 25 ciclos a misma temperatura/5 min. 5.- Ciclo de extensión (ext) para favorecer la incorporación de dNTPs a fragmentos de ADN cuya amplificación resulto ser incompleta (72°C/7 min) ( Sambrook & Russell, 2001; Glick & Pasternak, 1998). .

f).- Secuenciación nucleotídica y análisis estructural por electroferograma de los insertos de ADNc de las clonas inmunopositivas.- Los ensayos de restricción y amplificación por PCR empleados para caracterizar molecularmente los insertos de ADNc clonados en los plasmidos vectores de las clonas inmunopositivas permitieron estandarizar y técnicas de secuenciación nucleotídica automatizada por método de capilar, con el fin de determinar la secuencia estructural nucleotídica de los insertos de ADNc clonados mediante el análisis de los electroferogramas resultantes. Asimismo los estudios de amplificación por PCR permitieron establecer el criterio de inclusión para molecular de 0.6-2.2 Kb. Estas observaciones están basadas en la estimación de los tamaños moleculares promedios de una gran mayoría de ARNm que codifican precursores polipéptidos de péptidos bioactivos en el SNC de mamíferos que se llevó a cabo a través de la consulta de base de datos del GENBANK.

En forma breve, la secuenciación nucleotídica; basada en el método de secuenciación nucleotídica reportado originalmente por Sanger y colaboradores (1977) y modificado por Applied Biosystems; se llevó a cabo mediante procedimientos estándares de amplificación por PCR de insertos de ADNc clonado en el sistema vector (pBluescript S/K±) empleando oligonucleótidos complementarios a los sitios promotores de transcripción T3 /T7 (Gibco BRL) además de la incorporación terminal de nucleótidos fluorescentes siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. La secuenciación nucleotídica se realizó por ambos extremos — 5' y 3' — por triplicado, empleando un secuenciador automatizado Genetic Analyzer 310 (Applied Biosystems) que permite detectar longitudes promedio de 600-800 nucleótidos por cadena sentido y antisentido secuenciada, respectivamente. El análisis estructural de las secuencias nucleotídicas de los insertos de ADNc se llevó a cabo mediante la lectura y comparación de los electroferogramas obtenidos, empleando criterios de inclusión basados en la ausencia de ambigüedades, redundancias y deleciones de nucleótidos.

g).- Caracterización de la identidad estructural de los insertos de ADNc clonados y sus productos proteicos de traducción.- La identidad estructural de los insertos de ADNc de las clonas identificadas se llevó a cabo mediante el empleo de “softwares” computacionales de análisis estructural de ADN [BioEdit Sequence Alignment



Editor v 5.0.9 (NCSU)] y el programa de detección de marcos de lectura abierta (ORF, Open Reading Frame, por sus siglas en inglés) (NCBI) a través de la identificación de un codón preferencial de iniciación de la traducción (Vg., ATG) en el extremo 5' y un codón preferencial de terminación de traducción en el extremo 3' (Vg., TAA, TAG, TGA) en el ADNc secuenciado. La detección de estas secuencias estructurales consenso, en adición, a la identificación de secuencias nucleotídicas consenso de poliadenilación — poli(A) — en el segmento 3'-no codificante, entre otras, en los transcritos de ARNms identificados, permitió generar la búsqueda de secuencias homólogas de los ARNms clonados y sus productos de traducción deducible, mediante la detección de “hits” de homología estructural, empleando “softwares” ampliamente utilizados en la base de datos del GENBANK (NCBI), como son el programa “Nucleotide BLAST” y “Protein BLAST”, respectivamente.

**2.- Ensayos de radioligando-receptor.-** Los ensayos de unión de radioligando-receptor fueron estandarizados y empleados para determinar la selectividad y afinidad de unión de las secuencias peptídicas consenso de las EM1-2 por el receptor opioide mu (ver la sección de introducción y antecedentes específicos) en adición a otras nuevas secuencias peptídicas homólogas o heterólogas a las EMs, identificados en los productos proteicos de traducción deducible de los marcos de lectura abierta (ORF) identificados en los insertos de ADNc (ARNms) previamente clonados y secuenciados.

En forma breve, cerebros de rata de la cepa Wistar (200 g) fueron extraídos (n=40) y las regiones del hipocampo, estriado, corteza cerebral, hipotálamo, tallo cerebral, mesencefalo y medula espinal, fueron disectados, homogenizados en un buffer de Tris-HCL, pH 7.2 y las fracciones membranas aisladas de los precipitados obtenidos por centrifugación, siguiendo los procedimientos reportados por Zadina y colaboradores (1999). La concentración de proteínas se llevó a cabo mediante la aplicación del método de Lowry (MicroBCA, PIERCE) en microplaca, midiendo las unidades absorbancia en un lector de placas de ELISA Microplate Fluorescence Reader FL600 (BioTec). Los ensayos de unión se llevaron a cabo por procedimientos estándares reportados por Zadina y colaboradores (1997) empleando los péptidos sintéticos de la EM-1 (Tir-Pro-Trp-Fen-NH<sub>2</sub>) (Tocáis, LTD); el deca péptido sintético Y-8-A (Phoenix Pharmaceuticals) [deducido de la región

## **MATERIAL Y METODOS**

---

amino-terminal de la secuencia peptídica de un producto proteico identificado y aislado de las clonas inmunopositivas, denominada, Visinina-tipo-1 (Visinin-like protein-1)]; el antagonista farmacológico del receptor opioide  $\mu$ , Naloxona (SIGMA); empleando como trazador competidor; [ $^3\text{H}$ ]DAMGO (60Ci/mmol, NEN) [péptido sintético de alta afinidad y selectividad de unión por el receptor opioide  $\mu$ ].

**VIII. RESULTADOS**

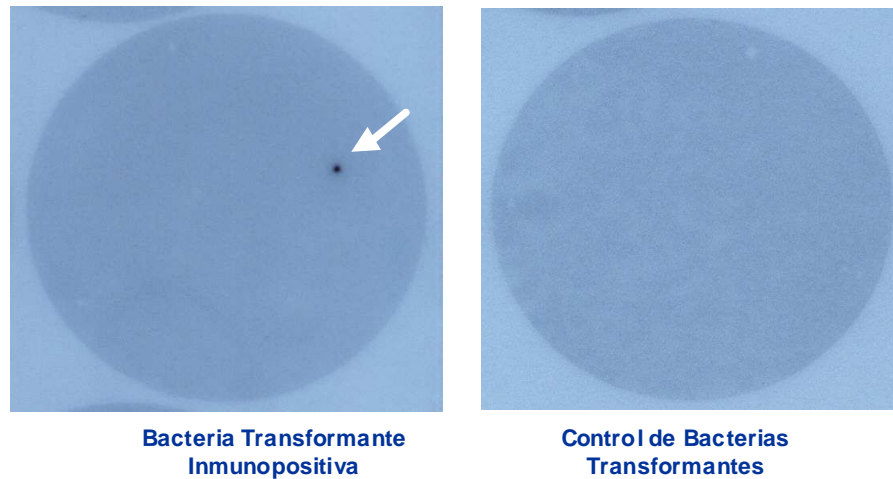
**1.0 IDENTIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE UN NUEVO ARNm (ADNC) QUE CODIFICA UNA SECUENCIA PEPTÍDICA TIPO ENDOMORFINA-2 EN UNA PROTEÍNA DE ALTA MASA MOLECULAR EN EL SNC DE MAMÍFEROS.**

Nuestros ensayos inmunológicos (Vg., ELISA competitivos, inmunoblot-dots y radioinmunoensayos) permitieron validar la especificidad inmunoreactiva de nuestros antisueros purificados por afinidad de antígeno, contra las secuencias peptídicas de la EM-1 y EM-2; así como validar sus capacidades funcionales para detectar la expresión de material IR-EM1-2 en especies proteicas y peptídicas de alto y bajo peso molecular, respectivamente, como se demostró a través de los ensayos de Western-blot y estudios cromatograficos de permeacion en gel. Asimismo, estos antisueros fueron capaces de detectar en similares ensayos cromatograficos, la presencia material peptídico endógeno IR-EM1-2 de bajo peso molecular, liberado bajo estimulación química despolarizante del tejido neuronal, empleando técnicas de superperusión *in vitro*, reconociendo por técnicas de HPLC, su identidad molecular similar a la EM-1. Todos estos estudios conjuntamente con los ensayos inmunohistoquímicos que demostraron la distribución neuroanatómica y expresión celular del material IR-EM1-2 en el cerebro de la rata, permitieron validar la capacidad funcional única de estos antisueros para detectar material IR-EM1-2 en proteínas y péptidos endógenos sintetizados en neuronas del SNC de la rata. En este contexto, la validación de la especificidad de nuestros antisueros en los diversos ensayos inmunológicos empleados, dieron pauta para emplear estos antisueros en una estrategia inmunomolecular, que permitiera el rastreo antigénico de material proteico inmunoreactivo a EMs y la subsiguiente identificación, aislamiento, clonación y caracterización estructural y molecular de genes candidatos que codificasen secuencias activas consenso de las EM1-2 en precursores proteicos polipeptídicos empleando un banco de expresión ADNc de cerebro total de ratón, clonado orientacionalmente en el sistema vector UNIZAP II del fago lambda (Stratagene) (véase figura 2).

**a).- Identificación, aislamiento y clonación de transformantes bacterianas inmunopositivas.-**

Nuestra estrategia inmunomolecular empleo un banco de expresión de ADNc de cerebro total de ratón (*Mus musculus*, BALB/c, whole brain, Stratagene) para tamizar por rastreo antigénico, un tamaño inicial de  $6.5 \times 10^5$  unidades formadoras de placa (paúl, por sus siglas en inglés) a través de ensayos de inmunoblot-dot y la aplicación de los antisueros primarios C14-APAA y C16-APAA; en adición, del empleo de un anticuerpo secundario de conejo — $^{125}\text{I}$ -IgG — y técnicas autoradiográficas, para facilitar la detección de señales radiográficas específicas con alta sensibilidad y reproducibilidad, del material lítico IR-EM1-2; transferida por adsorción a membranas de nitrocelulosa (véase figura 5 y sección de material y métodos). Estos ensayos dieron como resultado la identificación de 9 clonas inmunopositivas, cuyos insertos de ADNc originaron las señales radiográficas en placas líticas de transformantes bacterianas, generadas en el cultivo de agar. Un ejemplo representativo de la detección de una clona inmunopositiva, definida como clona 9.2, se ilustra en la figura 7.

El material fágico colectado de las placas líticas que originaron las señales autoradiográficas positivas fue expuesto a amplificación mediante transfección de la cepa bacteriana de la *E.coli*, y expuesto posteriormente a técnicas de escisión *in vivo*, amplificación y purificación de los plásmidos vectores que contiene subclonado los insertos de ADNc de interés (véase figura 4, panel A y sección de material y métodos).

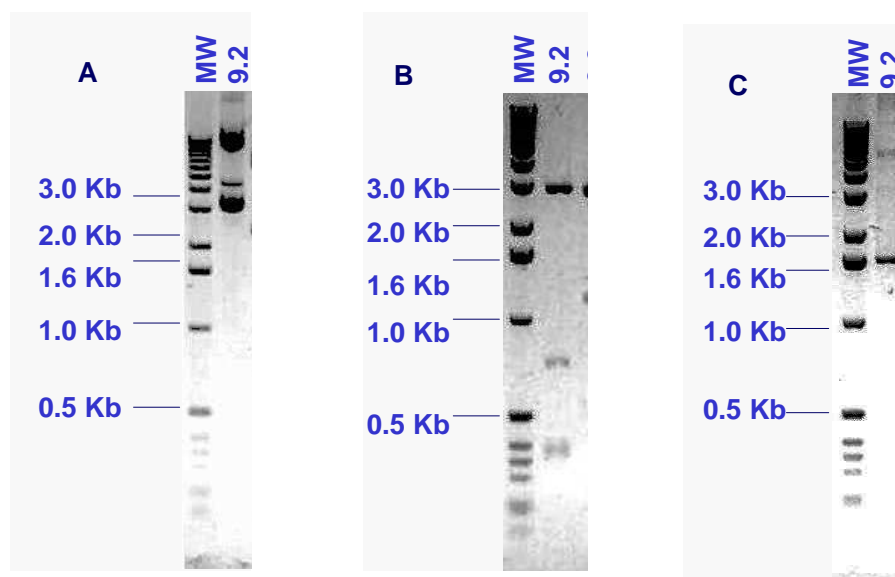


**Figura 7. Detección de señales inmunopositivas en los filtros de nitrocelulosa expuestos a revelado por técnica autoradiográfica. Panel izquierdo** muestra un ejemplo representativo de un filtro que muestra la detección de un colonia bacteriana que dio origen a una señal inmunopositiva cuando se incuban en presencia de nuestros anticuerpos primarios (C-14/ C-16 APAA) y el Ab secundario  $^{125}\text{I}$ -IgG. **Panel derecho** muestra un ejemplo representativo de filtros controles, donde las colonias bacterianas transformadas lisadas, fueron expuestas solamente a a la incubación con el anticuerpo secundario. Notese la nitidez de la mancha de la señal inmunopositiva, en relación con el fondo claro.

**b).- Determinación de la pureza y tamaños moleculares de las clonas inmunopositivas identificadas por análisis de restricción y técnicas de amplificación por PCR.** Con el fin de identificar los tamaños moleculares y pureza de los insertos de ADNc de las clonas inmunopositivas y en particular el inserto de ADNc de la clona 9.2, los vectores plasmídicos pBluescript S/K ( $\pm$ ) purificados fueron expuestos a digestión enzimática con las enzimas de restricción EcoR1-Xho1 (nucleasas que reconocen sitios consenso de corte de sobre el vector plasmídico pBluescript S/K  $\pm$  que flanquean el sitio de inserción/clonación de los insertos de ADNc) y métodos de amplificación por reacción de cadena de polimerasa (PCR). Los productos de reacción fueron expuestos a corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% (sección de material y métodos). Un ejemplo representativo de la aplicación de estas metodologías, se ilustra en la figura 8-A, que demuestra el análisis de restricción y el producto de amplificación por PCR del inserto de ADNc de la clona 9.2.

1).- Análisis de restricción de la clona 9.2.- Como se muestra en el panel A de la figura 21, el análisis de restricción del inserto de ADNc de la clona 9.2 mostró un tamaño molecular del inserto de  $\cong 1.6$  Kb, mostrando la generación de tres fragmentos de restricción; uno, con un tamaño molecular de  $\cong 0.8$  Kb y dos fragmentos de  $\cong 0.4$  Kb, respectivamente, lo que confirma la presencia de sitios de restricción dentro del inserto de ADNc de esta clona.

2).- Amplificación del inserto de ADNc por PCR.- Como se muestra en el panel B de la figura 8-B, el análisis electroforético del producto de amplificación por PCR confirmó la presencia de una sola banda de ADN con un tamaño molecular del inserto de ADNc de  $\cong 1.6$  Kb para esta clona, similar a lo detectado en los ensayos de análisis de restricción. La información obtenida de estos estudios confirmó la que este inserto de ADNc se encontraba completamente aislado y con la calidad y cantidad suficiente para proceder a su caracterización estructural mediante su secuenciación nucleotídica. Mas aun, los ensayos electroforéticos de esta clona, mostraron que los valores obtenidos de la longitud del inserto de ADNc se encontraban dentro del rango de valores promedio de ARNm's identificados a la fecha actual (0.8-2.8 Kb) y que codifican precursores polipeptídicos y secuencias consenso de péptidos neuroactivos en los mamíferos; mismos que están registrados en la base datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).



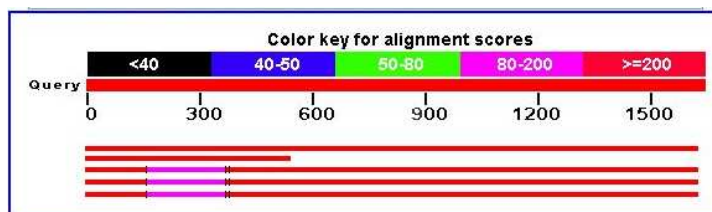
**Figura 8. Análisis electroforético del tamaño molecular de los insertos de ADNc de clonas que originaron las señales inmunopositivas.** (A) Determinación del tamaño molecular del plasmido vector pBluescript S/K ( $\pm$ ) purificado de una clona representativa, denominada 9.2, y expuesta a corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% (carga 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de DNA amplificado/carril). (B) Determinación del tamaño molecular del inserto de ADNc de la clona 9.2, donde el plasmido correspondiente fue expuesto al tratamiento con enzimas de restricción EcoR1-Xho1. (C) verificación del tamaño molecular y pureza de los insertos de ADNc por amplificación por PCR de la clona 9.2. Obsérvese que el producto de amplificación por PCR de la clona 9.2 es de 1.6 kb, en tanto que los fragmentos de restricción resultantes de 0.8, 0.4 y 0.4 Kb suman el tamaño molecular total del producto de amplificación por PCR (ver texto para mayor detalles).

**c).- Secuenciación nucleotídica y caracterización de la homología estructural del inserto de ADNc de la clona 9.2.** La secuenciación nucleotídica del inserto de ADNc de la clona 9.2, dio como resultado la identificación de una nueva secuencia de ARNm completo de 1639 pb (1.639 Kb). Los resultados de alineación por apareamiento entre secuencias nucleotídicas registradas en la base de datos del GENBANK (pairwise alignment, por sus siglas en inglés) mostró que el inserto de ADNc de la clona 9.2, posee una homología estructural muy estrecha de 99% con un ARNm aislado y clonado inicialmente por el grupo RIKEN en el cerebro de ratón adulto (*Mus musculus* Vsn1, 2094 pb ARNm; Accesion: NM 012038.3) (véase figura 9-A) y que codifica una proteína neuronal sensora de calcio, denominada como Visinina-1 —VSNL1 (Visinin-like-protein1) seguido de homología s estructurales inferiores de 90-92% con ARNms de la VSNL1 clonados y aislados del tejido nervioso y/o tejidos extraneurales de diversas especies mamíferas (*Rattus norvegicus*; *Bos taurus*; *Ovis aries*; *Canis familiaris*; *Pongo pigmeus*, *Macacca mulata*, entre otros) y/o homología s estructurales >75% y <89% con ARNms que codifican la VSNL1 de humano (*Homo sapiens* Vsn1, 1618 pb ARNm; Accesion: NM 003385.4) y/o con ARNms estructuralmente relacionados, que codifican proteínas sensoras de calcio en el tejido nervioso de ratón y/o humano, como son la hipocalcina-tipo-1 de ratón (*Mus musculus* HPCAL1 550 pb ARNm; Accesion: NM 0166677.1); la hipocalcina humana (*Homo sapiens* HPCA, 420 pb ARNm; Accesion: NM 002143.2) y/o la hipocalcina-tipo-1 (*Homo sapiens* HPCAL1, 412 pb ARNm; Accesion: NM 003385.4) (véase figura 9-B).



A

**VISININ-LIKE-PROTEIN 1 BLAST HOMOMOLOGY**  
(*GenBank Mus Musculus EST entries*)

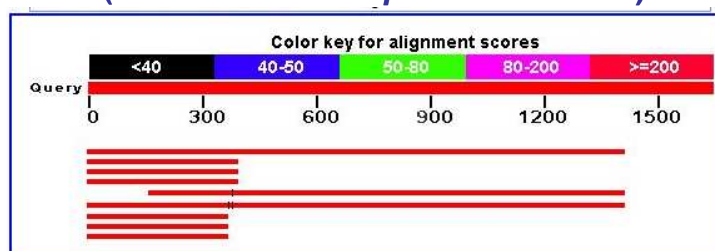


**Sequences producing significant alignments**

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<b>Transcripts</b>							
<a href="#">NM_012038.3</a>	Mus musculus visinin-like 1 (Vsnl1), mRNA	2904	2904	99%	0.0	99%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a> <a href="#">M</a>
<a href="#">NM_016677.1</a>	Mus musculus hippocalcin-like 1 (Hpcal1), mRNA	231	231	33%	2e-57	75%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a> <a href="#">M</a>
<b>Genomic sequences <a href="#">[show first]</a></b>							
<a href="#">NW_001030490.1</a>	Mus musculus chromosome 12 genomic contig, alternate assembly (based on Celera assembly)	2254	3153	99%	0.0	100%	
<a href="#">NT_039548.6</a>	Mus musculus chromosome 12 genomic contig, strain C57BL/6J	2239	3143	99%	0.0	100%	
<a href="#">NW_000041.1</a>	Mus musculus chromosome 12 genomic contig, alternate assembly (based on MGSCv3)	2239	3121	99%	0.0	100%	

B

**VISININ-LIKE-PROTEIN-1 BLAST HOMOMOLOGY**  
(*GenBank Homo Sapiens EST entries*)



**Sequences producing significant alignments**

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<b>Transcripts</b>							
<a href="#">NM_003385.4</a>	Homo sapiens visinin-like 1 (VSNL1), mRNA	1618	1618	85%	0.0	87%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a> <a href="#">M</a>
<a href="#">NM_134421.1</a>	Homo sapiens hippocalcin-like 1 (HPCAL1), transcript variant 2, mRNA	244	244	24%	2e-61	78%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a> <a href="#">M</a>
<a href="#">NM_002149.2</a>	Homo sapiens hippocalcin-like 1 (HPCAL1), transcript variant 1, mRNA	244	244	24%	2e-61	78%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a> <a href="#">M</a>
<a href="#">NM_002143.2</a>	Homo sapiens hippocalcin (HPCA), mRNA	209	209	24%	7e-51	76%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a> <a href="#">M</a>
<b>Genomic sequences <a href="#">[show first]</a></b>							
<a href="#">NT_015926.14</a>	Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, reference assembly	1140	1418	76%	0.0	89%	
<a href="#">NW_927719.1</a>	Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, alternate assembly (based on Celera assembly)	1140	1650	85%	0.0	89%	
<a href="#">NT_005334.15</a>	Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, reference assembly	231	231	22%	1e-57	78%	
<a href="#">NT_032977.8</a>	Homo sapiens chromosome 1 genomic contig, reference assembly	204	204	22%	3e-49	77%	
<a href="#">NW_921351.1</a>	Homo sapiens chromosome 1 genomic contig, alternate assembly (based on Celera assembly)	204	204	22%	3e-49	77%	

**Figura 9. Búsqueda de secuencias homólogas de ADNc (ARNm) en las bases de datos del GenBank empleando los programas computacionales del NCBI: Nucleotide BLAST (GenBank).** Un ejemplo representativo para la clona 9.2 se observa en la figura; en **(A)** se muestra del resultado obtenido de la homología estructural de la secuencia nucleotídica del inserto de ADNc de la clona 9.2, con secuencias homólogas reportadas en el ratón. En **(B) se muestra el resultado** de homología estructural de la secuencia nucleotídica del inserto de ADNc de la clona 9.2, con secuencias homólogas reportadas en el humano. Los colores indican los "hits" de homología hallados para este inserto.

**d).- Caracterización estructural del inserto de ADNc de la clona 9.2.** El análisis estructural de la secuencia nucleotídica del inserto de ADNc mostró la codificación de un marco de lectura abierta deducible de 573 nucleótidos (ORF, por sus siglas en inglés; ver sección de material y métodos) iniciando con el codón de inicio de traducción — ATG — en la posición 1 y terminando con el codón de paro de término de lectura — TGA — en la posición 570. Esta secuencia resultó continuar en una región 3' no-codificante (UTR, por sus siglas en inglés) de 1065 nucleótidos, seguido del codón de paro, terminando con una cola de poliadenosinas [poli(A)], con una extensión de 15 nucleótidos de longitud (15 mer) como se ilustra en la figura 10.. Este marco de lectura abierta de 573 bp mostró la generación de una proteína de 191 aminoácidos, cuya secuencia se muestra en la figura 11, A-C. Otras características estructurales interesantes, es la identificación de dos sitios de restricción para la enzima EcoRI (509 y 899) y otro sitio para la enzima XhoI (134) (lo que confirma los estudios de análisis de restricción sobre la generación de tres fragmentos de restricción). Más aun, el análisis estructural de esta clona, permitió identificar 11 repeticiones de secuencias consenso — CACA [(CACA)<sub>11</sub>] — en las posiciones 635-703 en la región 3' UTR, en adición de la secuencia consenso de poliadenilación — AATAAA — localizada 14-20 pb arriba de la cola de poli(A). Asimismo, esa región mostró tener codificado 5 segmentos repetidos de secuencias nucleotídicas consenso — ATTTA — en las posiciones: 1268-1272, 1377-1381, 1397-1401, 1548-1552. Nuestros estudios de secuenciación nucleotídica y análisis de homología estructural, mostraron la identificación de una nuevo ARNm completo que codifica una proteína funcional — VISININ-LIKE PROTEIN-1 — en el cerebro de ratón, y dada la importancia funcional de esta proteínas en su género, mereció ser documentada en la base de datos del GenBank (Anton y col., 2002) y cuyo registro se muestra a continuación:

**AY101375. Mus musculus visinin**

**[gi:21392360]**

LOCUS AY101375 1639 bp mRNA linear ROD 11-JUN-2002

DEFINITION Mus musculus visinin-like protein 1 mRNA, complete cds.

ACCESSION AY101375 VERSION AY101375.1 GI:21392360

KEYWORDS .

SOURCE house mouse.

ORGANISM Mus musculus Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1639)

AUTHORS Anton, B., Matus, M., Leff, P., Calva, J.C., Acevedo, R., Hernandez, A., Medecigo, M., Valdez, A., Sanchez-Lopez, R., Vergara, P., Torner, C., Segovia, J. and Alagon, A.

TITLE Searching for the endomorphin-1-2 pro-peptide precursor(s) protein(s): cloning of a protein encoding an endomorphin-2-like peptide sequence.

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1639)

AUTHORS Anton, B., Matus, M., Leff, P., Calva, J.C., Acevedo, R., Hernandez, A., Medecigo, M., Valdez, A., Sanchez Lopez, R., Vergara, P., Torner, C., Segovia, J. and Alagon, A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (01-MAY-2002) Molecular Neurobiology, National Institute of Psychiatry, Calz. Mexico-Xochimilco 101 Col. San Lorenzo Huipulco, Mexico, D.F. 14370, Mexico.

```

1  ATG GGG AAA CAG AAT AGC AAA CTG GCC CCA GAA GTC ATG GAG GAC CTG GTG AAG AGC ACT GAG TTC AAT GAG CAT GAG CTT AAG CAG TGG 90
1  M G K Q N S K L A P E V M E D L V K S T E F N E H E L K Q W 30
91  TAC AAG GGC TTC CTC AAG GAC TGT CCG AGC GGG AGG CTG AAC CTC GAG GAG TTC CAG CAG CTC TAT GTG AAG TTC TTC CCC TAT GGA GAT 180
31  Y K G F L K D C P S G R L N L E E F Q Q L Y V K  F F P Y  G D 60
181GCC TCC AAG TTC GCG CAG CAC GCC TTC CGC ACC TTC GAC AAG AAC GGT GAT GGC ACC ATC GAT TTC CGA GAG TTC ATC TGT GCC CTG TCC 270
61  A S K F A Q H A F R T F D K N G D G T I D F R E F I C A L S 90
271 ATC ACC TCC AGA GGT AGC TTT GAG CAG AAA CTG AAC TGG GCT TTC AAC ATG TAT GAT CTG GAC GGT GAC GGC AAG ATC ACC CGA GTG GAG 360
91  I T S R G S F E Q K L N W A F N M Y D L D G D G K I T R V E 120
361 ATG CTG GAG ATT ATC GAG GCT ATC TAC AAA ATG GTG GGC ACC GTG ATC ATG ATG AAA ATG AAT GAG GAT GGC CTG ACG CCT GAA CAG CGG 450
121 M L E I I E A I Y K M V G T V I M M K M N E D G L T P E Q R 150
451 GTG GAC AAG ATT TTC AGC AAG ATG GAT AAG AAC AAA GAT GAC CAG ATT ACA CTG GAT GAA TTC AAA GAA GCT GCA AAA AGC GAC CCT TCC 540
151 V D K I F S K M D K N K D D Q I T L D E F K E A A K S D P S 180
541 ATT GTA TTA CTT CTG CAG TGT GAC ATT CAG AAA TGA GCT GAT GTC GCT ATG GAC TGC ACA CAA GTC TTG ATG TTC CAT TCA GTC TGC AGT 633
181  I V L L L Q C D I Q K * 191
634 ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACC CCA CAC CCC ACA CCC CAC ACA ATT GCT TGG ACT ACC TAT AAA 723
724 TGG ACT TGC TTC TTG TGT TTG AAA CAC TTG TGT GCA TGA GAA TGT CAT TTG CTA ATG AAT TTT AAA AGC ATA TAT TAT AAA ACA AAT CTG ACA 816
817 ACC TGC CAC AAT GTG ATA TGT GTA ATA TCA TTT CAT TAA AAT ACA TCT TCC TCC AAA GCC TGG GCA GAA GCG TGC TGC AAA GAA TTC TAT 906
907 GAT TCT GTT ACA TGT TTG CTA ATG CTT GTG TCC CTT GAT TAT ATA ATA TTA GTA GCA CTG AGA CCC TTC CCC CAC GGT AAT GTA ACT TAT 996
997 TAT GGG CTG CGT CAC CAT TCT CCT GTA AAA TAG TAC TGGACA GAC ACA CAG GAG GAG CCC TTG GCT CCC TGT CTG GCC CAC ACA CAG 1083
1084 CTT GTA TTA TCA GTG AAT ATA AAT ATA CTA TAT TTG CAT GCC TTT TGG GTT TGC CTT AAT TCT TAC CTC ATT TGT AAC CTC TCA ATC TGG 1173
1174 AAA GAG CTG TTT TGG ATG AAT GCA GTA TAC AAC TTA AAA ATC CTG CTC AAC TAC TCA TTA AGT ATA ACT ACA TAT CTA TAG ACA CAA AGG 1263
1264 TAT TAT TTA TTG AAA GTA AAA ACA TAA TAA TGG GAA TGT ATT GAT TCT GTT TGA CGT TTC AAA GGC TTC CAG AAA GGT GGC AAT AGA TGT 1353
1354 CCC AAA TAA ATT TCT AAT AGT CGA TTT ACT TCC CTA ATT ATT AAT TTA TAG TTT TCA GCT CAG TGT TCA TAG GGG TCA GCT AGC CAT AAC 1443
1444 TTA CTA ATC TAC CCT GGA ATT TGC AAA TGA CTG GAC GTG GGG AAA GTC ACT GTC CAA CTT ATC ATC CAG CCC CTC CTT CCC CAA AGA TCA 1533
1533 ATA TGG CAT GTA ATA TTT AAA GAA AAC AGG AGA TTT GTT CAT TCT GGA AAA CAA TGC TCA TTA TGT GAC AAT AAA CTT TAT CTC ATG TGA 1623
1624 AAA AAA AAA AAA AAA 1638

```

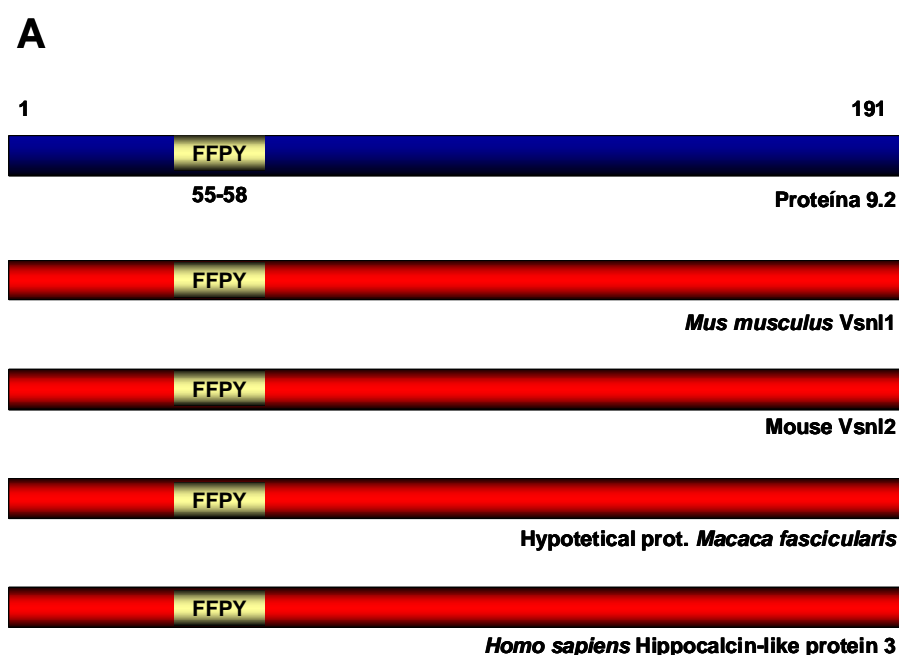
**Figura 10.- Gráfico representativo de la caracterización estructural del ADNc de la clona 9.2.** Obsérvese el codon de iniciación de traducción, y terminación, ATG y TGA respectivamente,. En la casila se detecta repetidos de secuencia en tandem CACA, como de segmentos de ATTTA en la región 3' UTR. Nótese que el inserto de ADNc caracterizado, resulta ser un ARNm completo que contiene codificado el segmento de terminación poli(A). Este inserto de ADNc codifica un secuencia total de 1639 nucleótidos, con una región codificante (marco de lectura abierta) de 573 nucleótidos la cual codifica una proteína de 191 aminoácidos con características importantes (ver texto para mayor información).

### **e).- Caracterización estructural del producto proteico codificado por el inserto de ADNc de la clona 9.2.-**

La alineación de aminoácidos deducidos del marco de lectura abierta de la inserto de ADNc de la clona 9.2, mostró una homología idéntica a proteínas neurales sensoras de calcio (NCS) derivadas del cerebro de diferentes especies, que incluyen la proteína *Visinina-1* de ratón, rata y humano (Polymeropoulos y col., 1995; Kajimoto y col., 1993; Kuno y col., 1992) en adición a proteínas relacionadas con proteínas neurales sensoras de calcio intracelular (Kajimoto y col., 1993; Kuno y col., 1992); como es la neurocalcina- $\alpha$  (Okasaki y col., 1992); las recoverinas; las hipocalcinas (HPCA) (Kobayashi y col., 1998, 1994, 1993) y proteínas tipo-hipocalcinas (HPCAL) (Ohya & Horowitz, 2002). Un ejemplo representativo de esta homología estructural entre proteínas sensoras de calcio se ilustra en la figura 11 A-B. Un rasgo estructural de interés que muestran todas estas proteínas sensoras de calcio; es que todas estas están conformadas por 191 residuos de aminoácidos; estructura que determina la expresión funcional de cuatro dominios de unión de calcio (EF-hand- calcium-binding domains) definidos como sitios I, II, III, IV, codificados por la secuencia consenso de aminoácidos en las posiciones 25-56, 66-92, 100-127, 150-178, respectivamente

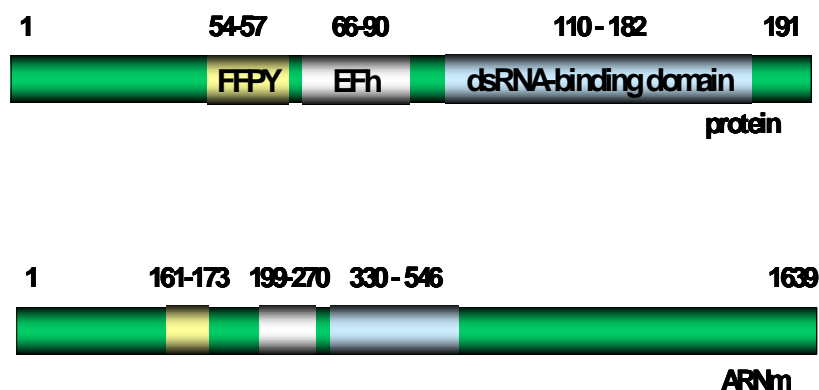
Un ejemplo representativo de estos dominios funcionales se ilustra en la figura 20, panel A-B. Mas aun, nuestros estudios de análisis estructural demostraron que la proteína de la clona 9.2, como otras proteínas sensoras de calcio (Burgoyne, 2004; Braunwell & Gundelfinger, 1999) tienen codificado en su secuencia consenso de aminoácidos, un segmento peptídico aceptor de grupos "miristilo" en el extremo amino-terminal de la proteína, representado por el residuo de glicina, en la segunda posición de la cadena polipeptídica, el cual resulta ser "miristilado" (figura 19, panel A). Esta característica molecular ha sido demostrada de alta relevancia, debido a que todas las proteínas sensoras de calcio que poseen este dominio estructural, permiten su asociación funcional con estructuras membranales en forma-dependiente de calcio (Lin y col., 2002; Ames y col., 1997). Mas aun, el análisis estructural comparativo entre la proteína de la clona 9.2 y ortólogos proteicos de VILIP-1 previamente identificados, mostró una región conservada de 73 residuos de aminoácidos (aminoácidos 110-182) que corresponden a un dominio estructural de unión de ARNm de doble cadena [double stranded (ds)-RNA binding domain, por sus siglas en ingles] como se ha demostrado en estudios funcionales *in vitro* para la proteína VILIP-1 de ratón (Mathisen y col., 1999) (figura 11, panel B-C).

El rasgo estructural mas predominante encontrado en la proteína de la clona 9.2, como en otras proteínas neurales sensoras de calcio (NCSP), es la presencia de la secuencia peptídica invertida de la *endomorfina-2* (H<sub>2</sub>N-....-FFPY-...-COO<sup>-</sup>) codificado en el extremo amino-terminal de la proteína en la posición 54-60, como se ilustra en la figura 11, A-B. Este hallazgo confirma sin lugar a dudas, la especificidad y selectividad de nuestros antisueros, purificados por afinidad de antígeno en reconocer tanto las secuencias sintéticas de las EM1-2 y material IR-EM1-2 endógeno en tejidos biológicos empleados en nuestros ensayos.



**Figura 11-A. Homología estructural entre el producto proteico de la clona 9.2 y proteínas estructuralmente relacionadas reportadas en el GeneBank.** La figura muestra la homología estructural entre la proteína codificada por el ARNm de la clona 9.2, identificada como una proteína neuronal sensora de calcio del tipo Visinin-like protein-1 (Vsn1) con otras proteínas sensoras de calcio (neuronal calcium sensor proteins, NCSPs, por sus siglas en ingles) y cuyos ARNm codifican productos proteicos de 191 aa. La proteína de la clona 9.2 muestra una alta homología estructural con la Vsn1-1 de cerebelo de ratón, identificada por el grupo RIKEN; con la neurocalcina- $\alpha$  de cerebro de bovino e hipocalcinas de ratón (véase texto y figura 9, para mayor detalles).

**B**



**C**

I  
MGKQNSKLAPEVMEDLVKSTEFNEHELKQWYKGFLKDCPSGR 42

II  
LNLEEFQQLYVKFPYGDASKFAQHAFRTFDKNGDGT I DFREF 85

III  
I CALS I TSRGSFEQKLNWAFNMYDLGDGK I TRVEMLEI IEAI 128

IV  
YKMGVTV IMMKNEDGLTPEQRVDKI FSKMDKNKDDQ ITLDE 170

FKEAAKSDPS I VLLLQCD I QK 191

**EM1:YPWF-NH<sub>2</sub>**  
**EM2:YPFF-NH<sub>2</sub>**



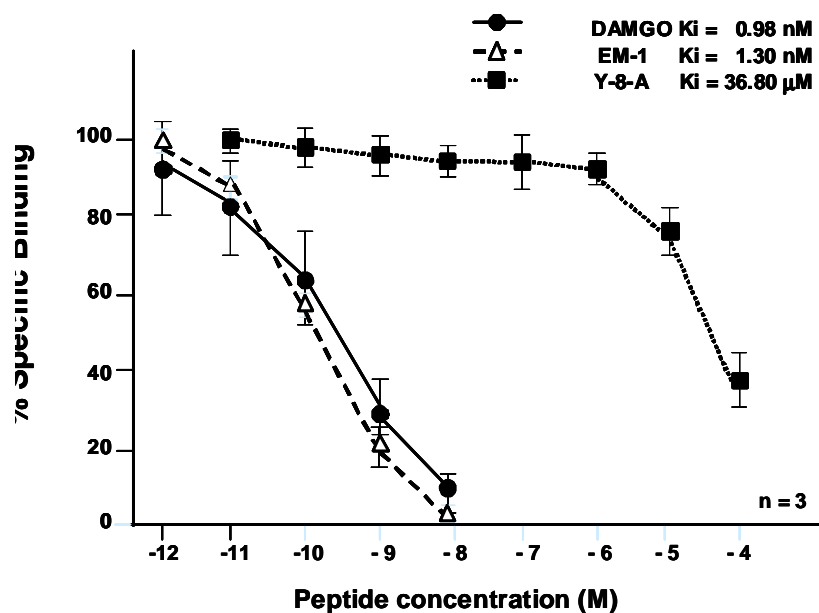
**Figura 11 B-C. Esquema gráfico representativo de la proteína de la clona 9.2 que codifica diferentes dominios estructurales característicos de las proteínas sensoras de calcio como es el caso de la *Vsn1*. (B)** La figura ilustra la proteína de la clona 9.2 con sus dominios estructurales que caracterizan a esta proteína. El panel inferior muestra los segmentos nucleotídicos del ARNm completo de la clona 9.2 que codifican cada uno de estos dominios funcionales en la proteína. Obsérvese el segmento invertido de la EM-2 (FFPY) en el extremo amino-terminal de la proteína, como la regiones consenso que codifican las dominios estructurales EF-hand (dominios relacionados con la unión de iones calcio) como el dominio estructural relacionado con el sitio de unión de ARNm de doble hebra (double strand, ds-RNA-binding domain, por sus siglas en ingles). **(C)** Representación grafica de los dominios conservados en la proteína de la clona 9.2 homólogos a la proteína *Vsn1*, que caracterizan los dominios funcionales de estas proteínas sensoras de calcio. Los secuencias de aminoácidos que caracterizan los dominios estructurales EF-hand (I-IV) se encuentran subrayados y el dominio estructural de unión de ARNms esta representado en el recuadro azul. Los dominios estructurales identificados en esta proteína clonada, fueron analizados mediante el programa computacional de búsqueda de dominios estructurales conservados del NCBI (NCBI conserved domain search, por sus siglas en ingles) (para mayores detalles ver texto).

**e).- Caracterización de la unión del segmento peptídico invertido de la endomorfina-2 por el receptor opioide *mu*.** El hallazgo estructural de la presencia de la secuencia invertida de endomorfina-2 en la proteína 9.2, permitió generar la hipótesis de que estas proteínas sensoras de calcio (Visininas) podrían ejercer una función adicional con respecto a su capacidad de modulación y unión del calcio intracelular; esto es, podían funcionar como ligandos proteicos endógenos del receptor opioide *mu*. En este contexto, estas proteínas serían capaces de modular y activar el receptor opioide *mu*, compartiendo esta nueva capacidad funcional con otros mensajeros químicos, del tipo de los factores neurotróficos, sintetizados y liberados por neuronas específicas, los cuales median sus acciones tróficas en neuronas post-sinápticas, a través de su unión a receptores membranales específicos (Vg., Trk1, Trk3) (Baloh y col., 2000). Bajo esta premisa, se evaluó la capacidad de unión de un fragmento peptídico sintético, que contiene codificado la secuencia peptídica de la EM-2 invertida, denominado, péptido Y-8-A (YVK-**FFPY**-GDA) al receptor opioide *mu*, y que representa la secuencia de la EM-2 codificado en el extremo H<sub>2</sub>N-terminal en el producto proteico de la clona 9.2 y proteínas sensoras de calcio intracelular (Vg., Visininas-1, 2, y 3) (véase figura 12). Mediante el empleo de ensayos farmacológicos clásicos de unión ligando receptor (Hau y col. 2002; Jiang y col., 2000; Hosohata y col., 1998) en presencia del péptido Y-8-A y péptidos opioides competidores, se evaluó la capacidad de unión del péptido sintético al receptor opioide *mu*, empleando purificaciones membranales de diferentes regiones del cerebro de la rata (ver sección de material y métodos).

El resultado de nuestros ensayos farmacológicos de unión-ligando receptor mostró una muy baja afinidad de unión del ligando peptídico sintético, Y-8-A por el receptor opioide *mu*, en comparación con la alta afinidad de unión observada para [<sup>3</sup>H]-DAMGO y la EM-1 (Zadina y col., 1997, 1999) (véase figura 12). El diseño de este fragmento peptídico lineal y la inclusión de estos aminoácidos adicionales para generar el péptido sintético Y-8-A, fue establecido en base a las características fisicoquímicas de los aminoácidos que la componen como de la conformación estructural tridimensional que adopta este decapeptido dentro de la estructura completa la proteína (véase figura 12). En este contexto, los ensayos de unión ligando-receptor, demostraron un desplazamiento muy pobre de [<sup>3</sup>H]-DAMGO por el péptido Y-8-A, mostrándose una muy baja afinidad de unión de este péptido sintético por el receptor opioide *mu* ( $K_i = 36.8 \mu\text{M}$ ) con respecto a los valores obtenidos de  $K_i$

---

para la EM-1 ( $K_i = 1.3 \text{ nM}$ ) y [ $^3\text{H}$ ]-DAMGO ( $K_i = 0.98 \text{ nM}$ ): valores que resultan ser completamente similares a los reportados por otros grupos (Hau y col., 2002; Jiang y col., 2000; Hosohata y col., 1998). Este resultado muestra que la constante de afinidad de unión del péptido Y-8-A por el receptor, se encuentra en el rango micromolar, lo que permite caracterizar su unión de muy baja afinidad, en tanto que la mayoría de los péptidos bioactivos que poseen una alta afinidad y selectividad de unión por sus receptores membranales, muestran constantes de afinidad de unión en el rango subnanomolar a fentomolar (v.g., 0.1-10 nM (Mizoguchi y col., 2002). Por lo tanto, es sobre la base de estos resultados, lo que hace imposible sustentar nuestra hipótesis inicial, que el péptido invertido de la este segmento peptídico invertido de la EM-2 codificado en la proteína 9.2 (Mis musculus, Visinin like protein-1) represente el segmento peptídico de unión al receptor opioide mu en la proteína 9.2, y por tanto, funcione dentro de la estructura proteica completa, como un nuevo ligando endógeno con capacidad fisiológica de activar y modular este mismo receptor (Gainetdinov y col., 2004; Zigmond y col., 1999).



**Figura 12.** Esquema grafico del ensayo de unión del péptido Y-8-A.

Grafico que muestra los ensayos de inhibición de unión radio-ligando receptor, mediante la competición por la unión del receptor opioide  $\mu$  en membranas purificadas del cerebro de la rata, empleando como ligandos competidores el péptido sintético Y-8-A y EM-1 y [<sup>3</sup>H]DAMGO. Obsérvese que el péptido Y-8-A no fue capaz de desplazar el trazador [<sup>3</sup>H]DAMGO, obteniéndose una muy baja respuesta de afinidad de unión por el receptor opioide  $\mu$  ( $K_i = 37 \mu\text{M}$ ) a diferencia de la EM-1, que mostró una alta capacidad de desplazar la unión del trazador, con una constante de afinidad de unión muy alta ( $K_i = 1.30 \text{ nM}$ ); valor que resulto ser similar a lo reportado por el grupo de Zadina y colaboradores (1997).

**IX. DISCUSION**

La tecnología de ADN recombinante en combinación con los procedimientos de clonación (Glick y Pasternak, 1998; Kaufman y Tobin, 1984) facilitaron la identificación, aislamiento y caracterización estructural y funcional de múltiples ARNm que codifican distintos precursores proteicos polipeptídicos; y que su vez, contienen codificado secuencias activas consenso de péptidos opioides y no opioides, con funciones endocrinas y/o neuromoduladoras en el SNC de mamíferos (Dores y col., 2002; Reinscheid y col., 2000). Dentro de estos ARNm identificados, cuatro familias de precursores proteicos de diferentes péptidos opioides fueron identificados y caracterizados a nivel estructural y molecular y que comprenden; la pro-opiomelanocortina (POMC) (Li & Chung, 1976); la pro-encefalina A (Noda y col., 1982; Gubler y col., 1982; Comb y col., 1982); la pro-dinorfina (Horikawa y col., 1983) y el precursor del sistema peptídico nociceptina/orfanina FQ (Saito y col., 1995; Nothacker y col., 1996). Estos precursores polipeptídicos generan durante su procesamiento postraduccional la liberación de péptidos bioactivos y/o neuroactivos del tipo de la  $\beta$ -endorfina (BE); la metionina y leucina-encefalinas (ME, LE); la dinorfina A y B; y los péptidos nociceptina/ orfanina FQ y nocistatina, respectivamente (Brownstein, 1993; Reinscheid y col., 1995; Meunier y col., 1995). Sin embargo, a la fecha actual, no existen evidencias científicas reportadas que demuestran la identificación y/o caracterización molecular de uno o mas precursores proteicos polipeptídicos (empleando técnicas recombinantes de ADN y clonación) que codifiquen las secuencias consenso de las EM-1 y EM-2, respectivamente (Zadina y col., 1997). No obstante del vasto numero de reportes científicos que describen la diversidad de actividades funcionales que ejercen estos nuevos ligandos peptídicos del receptor opioide mu en tejidos neurales y extraneurales (Zadina y col., 1999) incluyendo su amplia distribución y localización inmunohistoquímica en regiones del SNC del roedor y humano (Martin-Schild y col., 1999; E. Sánchez-Islas y col., 2000) a la fecha actual, existe una gran controversia sobre la consideración de la existencia y categorización de estos dos nuevos tetrapéptidos opioides amidados, como péptidos endógenos funcionales en el SNC de mamíferos. En este contexto, una forma de “esquivar” las estrategias moleculares, mismas que resultaron “fallidas” para identificar y clonar los putativos precursores proteicos de las EM1-2 en el SNC de mamíferos, es emplear una “*estrategia inmunomolecular de rastreo antigénico por anticuerpos*” para identificar y caracterizar material IR-EM1-2 en material proteico de

alta masa molecular. En este contexto, dos antisueros policlonales de conejo (C-14 APAA; C-16 APAA) fueron generados por el grupo del Dr. B. Antón y colaboradores (1999) contra las secuencias peptídicas sintéticas de las EM-1 y EM-2, purificados por técnicas de cromatografía de afinidad de antígeno y validados en su especificidad y selectividad inmunoreactiva contra las secuencias sintéticas de las EM-1 y EM-2 en los ensayos inmunológicos de ELISA competitivo; inmunoblot-dot y radioinmunoensayo en fase sólida, además de mostrar una ausencia de entrecruzamiento inmunológico con péptidos opioides y no opioides estructuralmente relacionados con las moléculas de las endomorfinas, empleados en estos estudios (Vg., ME, LE, TIR-W-MIF-1) como se ilustran en las figuras 1 y 2 (véase sección de antecedentes experimentales preliminares).

La validación de la especificidad de estos antisueros productivos de las EM1-2, permitió la utilidad en nuestra estrategia inmunomolecular de “rastreo antigénico por anticuerpos” de un banco de expresión de ADNc de cerebro total de ratón (*Mus musculus*, BALB/c, whole brain, Stratagene) (figuras 3, 4) empleado para transfectar la cepa bacteriana XL1-Blue MRF' de la *E. coli*, y lograr clonar e identificar subsiguientemente, el o los genes que codifican el precursor de las EM1-2, a partir del material IR-EM1-2 codificado en productos proteicos extraídos por lisis de colonias de transformantes bacterianas inmunopositivas (ver sección de material y métodos y figura 5). Mas aun, basados en la posibilidad de detectar una muy baja representatividad de ARNms que codificasen el o los precursor(es) proteico(s) de las endomorfinas, empleamos un título inicial de transfección de partículas virales (figura 5) de  $6.5 \times 10^5$  pfu. Este nos permitió asumir que por lo menos estaríamos en la posibilidad de detectar entre 1-10 transformantes inmunopositivas, cuyos ARNms identificados y clonados tendrían un rango de representatividad de  $\approx 0.0014$ - $0.0017\%$ ; una representatividad muy baja considerando la expresión funcional de un ARNm específico, que codifica un péptido opioide relevante e importante en el desarrollo de múltiples funciones en el cerebro de los mamíferos (Zadina y col., 1999).

En este contexto, el empleo de nuestros antisueros anti-EM-1/EM-2 (C-14 APAA/C-16 APAA) en los ensayos de inmunoblot-dot, en adición de un anticuerpo secundario anticonejo— $^{125}\text{I}$ -IgG —empleado para detectar señales autoradiográficas IR-EM1-2 mediante la aplicación técnicas ultrasensibles de exposición auto radiográfica (véase sección de material y métodos y figura 5, 7) dio como resultado la identificación de 9 clonas diferentes de transformantes inmunopositivas (posterior de la verificación del

aislamiento individual de cada clona, en dos ciclos subsiguientes de transfección/subclonación y detección de señales radiográficas inmunopositivas de transformantes bacterianas de la E. Coli, transfectadas con un bajo título de fagos; 200 pfu's). Un ejemplo representativo de la aplicación de esta estrategia inmunomolecular y de la detección de señales autoradiográficas de transformantes inmunopositivas, es la clona identificada, como clona 9.2, misma que se muestra en la figura 7.

La identificación de esta clona permitió el aislamiento y purificación del vector plasmídico pBlueScript SK (+/-) (subclonado en sistema del vector viral de infección-el fago lambda UNI-ZAP-XR) y de su inserto de ADNc, que dio origen a la señal inmunopositiva detectada, con el objetivo de proceder a la caracterización estructural y molecular, mediante la aplicación de ensayos moleculares de análisis de restricción y amplificación de los insertos ADNc por PCR, respectivamente. Estos estudios mostraron un tamaño molecular de 1.6 Kb para el inserto de ADNc purificado de esta clona identificada (véase figura 8).

La caracterización del tamaño molecular del inserto de ADNc de la clona 9.2, quedó confirmada al demostrar la secuencia nucleotídica completa de la clona, con un total de 1639 bp (1.64 kb) (véase figura 10). Estos estudios de caracterización estructural del inserto de ADNc de esta clona mostraron la identificación de un nuevo ARNm completo, basado en las características moleculares comunes de los transcritos de ARNm; que codifican proteínas de exportación/secreción, además de precursores polipeptídicos de múltiples péptidos bioactivos en tejidos neurales y extraneurales de especies mamíferas y no mamíferas (Lewin, 2000; Kandel y col., 2000). En este contexto, la caracterización estructural de este ARNm de la clona 9.2, mostró una región no-codificante en el extremo 3' (UTR) de 1065 pb, terminando con un segmento de poliadenilación [poli(A)] de 15 bp de longitud; y una región no-codificante en el extremo-5' (UTR) de 569 bp, que presenta una secuencia de Shine-Dalgarno, que determina la unión del transcrito de ARNm con sistema ribosomal del rER (Lewin, 2000). Ambas regiones no codificantes mostraron estar separados por una región codificante o marco de lectura abierta deduccional de 573 nucleótidos; misma que codifica una proteína funcional de 191 aminoácidos con características biológicas importantes (véase figuras 10 y 11) de acuerdo con los resultados de la búsqueda de homología estructural entre el inserto de ADNc de la clona 9.2 y otros

ARNms previamente clonados, identificados y reportados en la base de datos del GENBANK/NCBI.

Los estudios de homología estructural por alineamiento de secuencias nucleotídicas consenso, mostraron que nuestro ARNm de la clona 9.2, guarda una muy estrecha homología del 98-99% con ARNms de cerebro de ratón adulto, que codifican una proteína neuronal sensora de calcio, denominada como Visinina-1 —VSNL1 (Visinin-like-protein1) (*Mus musculus* Vsn1, 2094 pb ARNm; Accesion: NM 012038.3) seguido de homologas estructurales < 92% con ARNms que codifican la VSNL1-3, así como, otras neurocalcinas del tipo de las hipocalcinas (HPCAL) y/o proteínas tipo hipocalcinas (HPCAL1) sinterizadas en el tejido nervioso y/o tejidos extraneurales de diversas especies mamíferas (*Rattus norvegicus*; *Bos taurus*; *Ovis aries*; *Canis familiaris*; *Pongo pigmeus*, *Macacca mulata*, entre otros) incluyendo el humano (véase figura 9, A-B). Los resultados sobre la identificación, aislamiento y caracterización estructural de esta clona, permitió su registro en la base de datos del GEWNBANK/NCBI (2002), reportando el primer ARNm completo de su tipo; el cual codifica la proteína sensora de calcio, VSNL1 en el cerebro de ratón (B. Antón y col., 2000) (*Mus musculus* visinin-like protein 1 mRNA, complete cds; AY101375 1639 bp mRNA linear ROD 11-JUN-2002). Un rasgo estructural del producto de traducción de este ARNm [no detectado y/o reportado previamente por ningún grupo de investigadores involucrados con el estudio de estas moléculas (Mathisen y col., 1999; Lenz y col., 1992; Lin y col., 2002; Braunwell & Gundelfinger, 1999)] es el hallazgo de la presencia de la secuencia invertida de la endomorfin-2 (H<sub>2</sub>N-...-FFPY-...-COO<sup>-</sup>) codificado en el extremo amino-terminal de la proteína, en la posición 54-60, como se ilustra en la figuras, 10-A y 11 A-C. Este rasgo estructural, confirma la validación de la especificidad y selectividad de nuestros antisueros (C-14 APAA/C-16 APAA) por reconocer las secuencias peptídicas de EM1-2 y/o secuencias tipo EMs y detectado como material IR-EM1-2, formando parte o codificado en componentes proteicos de alta y baja masa molecular (véase hipótesis experimental de la tesis) como lo muestran diversos ensayos inmunológicos realizados por el Dr. B. Antón y colaboradores (B. Antón y col., 2000, 2001, 2005) como son la cromatografía de permeación en gel y Western-blot de extractos peptídicos y proteicos de regiones anatómicas del cerebro de la rata (datos no mostrados en la presente tesis) e identificado en nuestros ensayos inmunoblot-dot como una transformante bacteriana inmunopositiva permitió y dió origen al análisis estructural y molecular del inserto de ADNc de la clona 9.2.



Mas aun, un rasgo estructural que comparten n la proteína de la clona 9.2 y las proteínas neuronales sensoras de calcio es que todos estas están conformadas por 191 residuos de aminoácidos (véase figura 11-A); en adición de la expresión de dominios funcionales de unión de calcio (EF-hand- calcium-binding domains); definidos como sitios I, II, II, IV, codificados por la secuencia consenso de aminoácidos en la posiciones 25-56, 66-92, 100-127, 150-178, respectivamente, de estas proteínas (Mathisen y col.,1999; Lenz y col., 1992; Lin y col., 2002) (véase figura 11, B-C). Mas aun, otro rasgo estructural detectado en nuestra clona y este grupo de proteínas, es la presencia del residuo de glicina, codificado en la segunda posición del extremo amino-terminal de la VSNL1 (Visinin-like-protein1) (véase figura 10-C) el cual resulta ser unaceptor funcional de ácidos grasos complejos, como es el grupo “miristilo” y definido como proceso intracelular de “miristilación” (Lin y col., 2002; Ames y col., 1997). Esta modificacion estructural genera un cambio conformacional en la proteína en forma-dependiente de calcio (calcium mystiroil switch, por sus siglas en ingles) favoreciendo su activacion y subsecuente asociación con estructuras membranales (Lin y col., 2002) y/o con proteínas citoplásmicas (Spilker y col., 2002; Lenz y col., 1992; Ames y col., 1997). Por ejemplo, estudios moleculares empleando animales transgénicos que expresan una forma mutante de la VSNL1, producida por la substitución del aminoácido GLI(2)/ALA(2) en el ARNm de la VSNL1 (mutVSNL1) versus la forma nativa de la proteína en animales controles (mysVSNL1), han demostrado que la “acetilación/miristilación dependiente de calcio” en la molécula de VSNL1, genera una rápida translocación y expresión funcional de diferentes de proteínas membranales y receptores del compartimiento citoplásmico-a la superficie membranal, como se ha demostrado, para las subunidades  $\alpha 4\beta 2$  del receptor colinérgico (AChR) (Braunwell et al, 1999); cuya expresión funcional (evaluada en función de la sensibilidad de su agonismo a fármacos análogos) y densidad de receptores, mostró estar incrementada en células cerebelosas de Purkinge de ratón (Lin-Lin et al, 2002) así como del canal iónico de  $K^+$ -tipo A en células piramidales del hipocampo de roedores (An et al., 2000) en comparación con la forma mutante no-funcional. En extensión, diversos estudios han mostrado que la acetilación o “miristilación” del residuo de Gli(2) en diversas proteínas sensoras de calcio (NCSPs, por sus siglas en ingles) (Vg., neurocalcina- $\delta$ ; neurocalcina- $\alpha$  e

hipocalcinas) y su resultante activación en dependencia de calcio; facilita su translocación rápida y reversible a compartimientos membranales y submembranales en dendritas de células piramidales y granulares del hipocampo y células de Purkinge del cerebelo de roedores, respectivamente (Orito y col., 2001; Spilker y col., 2000; Kobayashi y col., 1993; Ladant, 1995). Por lo tanto, estas modificaciones funcionales sirven de señalamiento celular para guiar y señalar el destino final de múltiples moléculas proteicas a sus compartimientos subcelulares y membranales en las neuronas del cerebro de mamíferos, incluyendo el humano (Spilker y col., 2000); además de regular la actividad de segundos mensajeros intracelulares (Boekhoff y col., 1997).

Otro rasgo estructural identificado en la proteína de la clona 9.2, presente en proteínas estructuralmente y funcionalmente relacionadas, es la codificación de una secuencia nucleotídica consenso de 73 aminoácidos (110-182) en la región 3'-no codificante (véase figura 11, B-C); que posee una capacidad singular y excepcional de unir ARNms específicos de doble-hebra, en forma dependiente de  $Ca^{2+}$  (Matthisen et al, 1999) además de regular su translocación subcelular y traducción en el sistema microsomal/polisomal dendrítico en neuronas del SNC mamíferos, como se ha demostrado para el ARNm que codifica el precursor de la vasopresina y/o el ARNm que codifica el receptor membranal de la neurotrofina-3 (NT-3)— el receptor TrkB (Mohr y col., 2002; Matthisen et al, 1999).

Por lo tanto, estos datos permiten proponer que la proteína de la clona 9.2; al igual que la VSNL1, juega un papel funcional fundamental en la localización subcelular de ARNms específicos en campos dendríticos específicos de neuronas que poseen una alta actividad sináptica (Spilker y col., 2002; Boekhoff y col., 1997; Kiebler & DesGroseillers, 2000; Lenz y col., 1992), posiblemente regulando la expresión funcional del receptor opioide mu.

Basados en el hallazgo estructural de la presencia de la secuencia consenso invertida de la EM-2 en el extremo  $H_2N$ -terminal del producto proteico del ARNm de la clona 9.2, como en otras neurocalcinas, nos permitió postular la hipótesis de que este segmento peptídico pudiese modular la actividad funcional del receptor opioide mu, posterior de su unión a este.

Para evaluar este objetivo, se diseñó un péptido sintético de 10 aminoácidos que contuviese la secuencia invertida de la EM-2 (figura 21 A-B) denominado Y-8-A, dado que esta secuencia mostró una longitud peptídica suficiente para evaluar la posible unión de este segmento al receptor opioide mu. La elección de la longitud del segmento peptídico fue basado por estudios de estructura-función de diversos péptidos bioactivos, que demuestran que péptidos opioides con secuencias peptídicas razonablemente mas pequeñas (Vg., ME, LE) son capaces de mostrar activación de sus receptores cognatos, posterior de su unión mediana/alta afinidad por sus receptores opioides membranales (Lazarus y col., 1996). Los ensayos de radioligando receptor, utilizando usando [<sup>3</sup>H]-DAMGO como agonista competidor del péptido Y-8-A y la EM-1, mostraron que este péptido sintético poseía una muy baja afinidad de unión por el receptor opioide mu ( $K_i = 36.5 \mu\text{M}$ ) en (ver figura 12). Este resultado experimental nos permitió sugerir que este tipo de proteínas, que codifican la secuencia invertida de la EM-2, al menos desde el punto de vista de este dominio estructural, no son capaces de modular la actividad funcional del receptor opioide mu, con excepción de sus ligandos peptídicos opioides sintetizados en el cerebro de los mamíferos.

En conclusión, nuestra estrategia inmunomolecular empleada para identificar y caracterizar el o los genes que codifican el o los precursor(es) proteico(s) de las endomorfina ha sido validada y justificada desde el punto de vista de la identificación de un nuevo ARNm específico (Clona 9.2) que codifica una secuencia peptídica tipo de la EM-2, cuya caracterización estructural y funcional permitió identificar a este producto proteico, como una proteína funcional sensora de calcio, que poseen una capacidad de regular la actividad biológica de proteínas/receptores de superficie; además de regular la translocación dendrítica de ARNms específicos y la expresión funcional de proteínas membranales (Vg., receptores) en vías neuronales específicas implicadas en eventos de plasticidad sináptica y/o constante actividad sináptica, como ocurren con el fenómeno celular de aprendizaje y memoria — LTP— demostrado en el hipocampo y campos corticales en el cerebro de los mamíferos.

**X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.**

- 1.- Abbadie C, Rossi GC, Orciuolo A, Zadina JE, Pasternak GW. Anatomical and functional correlation of the endomorphins with mu opioid receptor splice variants. *Eur J Neurosci.* 2002;16(6):1075-82.
- 2.- Acher R, Chauvet J, Chauvet MT. Man and the chimaera. En: Ivell R, Russell JA. (Eds.) *Oxytocin: cellular and molecular approaches in medicine and research. Advances in Experimental Medicine and Biology.* Plenum Press, New York. 1995; pp. 615–627.
- 3.- Aicher SA, Mitchell JL, Swanson KC, Zadina JE. Endomorphin-2 axon terminals contact mu-opioid receptor-containing dendrites in trigeminal dorsal horn. *Brain Res.* 2003; 977(2): 190-8.
- 4.- al-Yousuf SA, Pow DV, Mizuno N. Ultrastructural demonstration of exocytosis of neurosecretory granules in the neurohypophysis of the frog *Rana temporalia*. *Neurosci Lett.* 1993;159(1-2):32-4.
- 5.- Ames JB, Ishima R, Tanaka T, Gordon JI, Stryer L, Ikura M. Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. *Nature.* 1997; 389(6647):198-202.
- 6.- Ames J.B. Ishima R. Tanaka T. Gordon J.I. Stryer L. Ikura M. Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. *Nature* 1997;389. 198-202.
- 7.- Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Loudon CS, Foley JJ, Sauermech CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DW, Ohlstein EH, Bergsma DJ and Douglas SA. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature.* 1999; 401(6750): 282-6.
- 8.- An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, Rhodes KJ. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature.* 2000;403(6769):553-6.
- 9.- Azuma Y, Ohura K, Wang PL, Shinohara M. Endomorphins 1 and 2 modulate chemotaxis, phagocytosis and superoxide anion production by microglia. *J Neuroimmunol.* 2001; 119(1):51-6.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

---

- 10.- B. Antón, M. Matus , H. Gompfh , J.C. Calva , A. Salazar, R. Arreola, L. Parra-Gómez, R. Acevedo, P. de los Heros, B. Peng, S.I..Cruz, G. Gamba, C. Allen , J. Pintar, P. Leff. Cloning and functional characterization of a novel opioid peptide system for the mu opioid receptor. Poster sesion. International Narcotics Research Conference. Annapolis, MD. July, 2005.
- 11.- B. Antón, P.Leff, M. Matus, J.C. Calva, C. Torner, R. Acevedo, A. Hernández, M. Medécigo, A. Valdes, R. Sánchez-Lopez, P. Vergara, J. Segovia, A. Alagón. Searching for the Endomorphin 1-2 Propeptide precursor(s) proteins(s): Cloning of a protein encoding an endomorphin-2-like peptide sequence. 32nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Orlando, Fla., Nov, 2-7, 2002.
- 12.- B. Antón., I. Martínez., J.C. Calva., A. Valdez, M. León -Olea, P. Leff. Immunohistochemistry for endomorphins in the rat CNS. Biosis Methods Finder Citation. Enero, 2001.
- 13.- B. Anton., I. Martinez., J.C. Calva., A. Valdez., M. León -Olea., P. Leff. Immunohistochemistry for endomorphins in the rat CNS. Neurosci Abstr. Vol. 24.(1): 851. 28th Anual Meeting of the Society for Neuroscience, Los Angeles, CA., Nov, 1998.
- 14.- Boekhoff I, Braunewell KH, Andreini I, Breer H, Gundelfinger E. The calcium-binding protein VILIP in olfactory neurons: regulation of second messenger signaling. Eur J Cell Biol 1997; 72(2):151-8.
- 15.- Bradbury AF, Smyth DG, Snell CR, Hulme EC, Birdsall NJM. C-fragment of lipoprotein has high affinity for opiate receptors. Nature (London) 1976; 260: 793-795.
- 16.- Braunewell KH, Gundelfinger ED. Intracellular neuronal calcium sensor proteins ; a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. Cell Tissue Res 1999; 295;1-12.
- 17.- Brownstein MJ, Palkovits M, Saavedra JM, Bassiri RM, Utiger RD. Thyrotropin-releasing hormone in specific nuclei of rat brain. Science. 1974; 185(147):267-9.
- 18.- Brownstein MJ. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. Proc Natl Acad Sci USA.1993; 90(12):5391-3.

- 19.- Brownstein MJ. Studies of the distribution of biologically active peptides in the brain. *Adv Exp Med Biol.* 1977;87:41-8.
- 20.- Bujdoso E, Jaszberenyi M, Gardi J, Foldesi I, Telegdy G. The involvement of dopamine and nitric oxide in the endocrine and behavioural action of endomorphin-1. *Neuroscience.* 2003; 120(1): 261-8.
- 21.- Bunzow JR, Saez C, Mortrud M, Bouvier C, Williams JT, Low M, Grandy DK. Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett.* 1994; 347(2-3):284-8.
- 22.- Burgoyne DR. The neuronal calcium-sensor proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2004 ;1742 (1-3):59-68.
- 23.- Cetin Y, Aunis D, Bader MF, Galindo E, Jorns A, Bargsten G, Grube D. Chromostatin, a chromogranin A-derived bioactive peptide, is present in human pancreatic insulin (beta) cells *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(6):2360-4.
- 24.- Champion HC, Bivalacqua TJ, Zadina JE, Kastin AJ, Hyman AL, Kadowitz PJ. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002; 29(3):229-32. Role of nitric oxide in mediating vasodilator responses to opioid peptides in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002; 29(3):229-32.
- 25.- Chavkin C, James IF, Goldstein A. Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor. *Science* 1982; 215 (4531): 413-5.
- 26.- Civelli O, Nothacker HP, Reinscheid R. Reverse physiology: discovery of the novel neuropeptide, orphanin FQ/nociceptin. *Crit Rev Neurobiol.* 1998; 12(3):163-76.
- 27.- Civelli O, Nothacker HP, Saito Y, Wang Z, Lin SH, Reinscheid RK. Novel neurotransmitters as natural ligands of orphan G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* 2001; 24(4): 230-7.
- 28.- Comb, M., Seeburg, P.H., Adelman, J., Eiden, L. & Herbert, E. Primary structure of the human Met-and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature.* 1982; 295: 663-666.
- 29.- Cortese R, Monaci P, Luzzago A, Santini C, Bartoli F, Cortese I, Fortugno P, Galfre G, Nicosia A, Felici F. Selection of biologically active peptides by phage display of random peptide libraries. *Curr Opin Biotechnol.* 1996; 7(6):616-21.
- 30.- Coulouarn Y, Lihmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, Conlon JM, Bern HA, Vaudry H. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II

- 31.- precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(26): 15803-8.
- 32.- Coventry TL, Jessop DS, Finn DP, Crabb MD, Kinoshita H, Harbuz MS. Endomorphins and activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J Endocrinol*. 2001;169(1):185-93.
- 33.- Czapla MA, Gozal D, Alea OA, Beckerman RC, Zadina JE. Differential cardiorespiratory effects of endomorphin 1, endomorphin 2, DAMGO, and morphine. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(3 Pt 1):994-9.
- 34.- Czapla MA, Zadina JE. Reduced suppression of CO<sub>2</sub>-induced ventilatory stimulation by endomorphins relative to morphine. *Brain Res* 2005;1059(2):159-66.
- 35.- Darland T, Grandy DK. The orphanin FQ system: an emerging target for the management of pain? *Br J Anaesth*. 1998;81(1):29-37.
- 36.- Darlison MG, Richter D. Multiple genes for neuropeptides and their receptors: co-evolution and physiology. *Trends Neurosci*. 1999; 22(2):81-8.
- 37.- Deschenes RJ, Lorenz LJ, Haun RS, Roos BA, Collier KJ, Dixon JE. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rat preprocholecystokinin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81(3):726-30.
- 38.- Doi N, Brown CH, Cohen HD, Leng G, Russell JA. Effects of the endogenous opioid peptide, endomorphin 1, on supraoptic nucleus oxytocin and vasopressin neurones in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol*. 2001;132(5):1136-44.
- 39.- Dores RM, Lecaude S, Bauer D, Danielson PB. Analyzing the evolution of the opioid/orphanin gene family. *Mass Spectrom Rev*. 2002;21(4):220-43.
- 40.- Du Vigneaud V, Ressler C, Trippett S (1953) The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem* 205: 949–957.
- 41.- E. Sánchez-Islas, C. Ridaura, R. Acevedo, A. Morales , J.C. Calva, A. Valdez, M. León-Olea, P. Leff, B. Antón. Comparative immunohistochemistry for endomorphins and mu opioid receptor in the human pons-medulla and spinal cord. *Neurosci Abstr*. Vol. 30 (1): 634. 30th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans., 4-11, November, 2000.
- 42.- Edwards RH. The transport of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Curr Opin Neurobiol*. 1992; 2(5):586-94.
- 43.- Eipper BA, Stoffers DA, Mains RE The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. *Annu. Rev. Neurosci*. 1992;15:57-85.

- 44.- Eng J, Shiina Y, Straus E, Yalow RS. Post-translational processing of cholecystokinin in pig brain and gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982; 79(19):6060-4.
- 45.- Fichna J, Janecka A, Costentin J, Do Rego JC. The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacol Rev*. 2007; 59(1):88-123.
- 46.- Fisher JM, Sossin W, Newcomb R, Scheller RH. Multiple neuropeptides derived from a common precursor are differentially packaged and transported. *Cell*. 1988; 54(6):813-22.
- 47.- Fraboulet S, Boudouresque F, Delfino C, Fina F, Oliver C, Ouafik L. Effect of thyroid hormones on peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase gene expression in anterior pituitary gland: transcriptional studies and messenger ribonucleic acid stability. *Endocrinology*. 1996;137(12):5493-501.
- 48.- Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci*. 2004; 27:107-44.
- 49.- Glick RB, Pasternak JJ. Recombinant DNA technology. In *Molecular Biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA*, 2nd edition (Glick RB, Pasternak JJ., eds.) ASM Press Wasington, DC. 1998; pp: 45-77.
- 50.- Goldman E, Zubay G. Protein synthesis, targetting and turnover. In *Biochemistry* (Zubay G, ed.) WCB/McGraw-Hill Co., N.Y., 1998; pp, 851-879.
- 51.-
- 52.- Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L. Dynorphin (1-13) and extraordinary potent opioid peptide. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1979; 79: 6666-70.
- 53.- Gong J, Strong JA, Zhang S, Yue X, DeHaven RN, Daubert JD, Cassel JA, Yu G, Mansson E, Yu L. Endomorphins fully activate a cloned human mu opioid receptor. *FEBS Lett*. 1998; 439(1-2):152-6.
- 54.- Greenwell TN, Martin-Schild S, Inglis FM, Zadina JE. Colocalization and shared distribution of endomorphins with substance P, calcitonin gene-related peptide, gamma-aminobutyric acid, and the mu opioid receptor. *J Comp Neurol*. 2007;503(2):319-33.
- 55.- Gryz K, Jarzebinski J, Traczyk WZ, Wilmanska D. Substance P isolated from bovine hypothalamus: amino acid composition. *Acta Physiol Pol*. 1977; 28(4):383-9.



- 56.- Gubler U, Seeburg P, Hoffman BJ, Gage LP, Udenfriend S. Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. *Nature*. 1982; 295(5846):206-8.
- 57.- Hackler L, Zadina JE, Ge LJ, Kastin AJ. Isolation of relatively large amounts of endomorphin-1 and endomorphin-2 from human brain cortex. *Peptides*. 1997;18(10):1635-9.
- 58.- Hammerschlag R, Stone GC, Bolen FA, Lindsey JD, Ellisman MH. Evidence that all newly synthesized proteins destined for fast axonal transport pass through the Golgi apparatus. *J Cell Biol*. 1982; 93(3):568-75.
- 59.- Harlow E. and Lane D. *Antibodies: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol. 1: 1999.
- 60.- Harrison LM, Kastin AJ, Zadina JE. Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and antiopiates. *Peptides*. 1998;19 (9):1603-30.
- 61.- Hau VS, Huber JD, Campos CR, Lipkowski AW, Misicka A, Davis TP. Effect of guanidino modification and proline substitution on the in vitro stability and blood-brain barrier permeability of endomorphin II, *J Pharm Sci*. 91 (2002) 2140-2149.
- 62.- Hewes RS, Taghert PH. Neuropeptides and neuropeptide receptors in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Res*. 2001;11(6):1126-42
- 63.- Hockfield S., Carlson S., Evans C., Levitt P., Pintar J., Siverstein L. In *Molecular Probes of the Nervous System: Selected Methods for Antibody and Nucleic Acids and Probes* (1993). Vol 1. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 64.- Hökfelt T. Neuropeptides in perspective: The last ten years. *Neuron*: 1991, 7: 867–879.
- 65.- Horikawa S, Takai T, Toyosato M, Takahashi H, Noda M, Kakidani H, Kubo T, Hirose T, Inayama S, Hayashida H, et al. Isolation and structural organization of the human preproenkephalin B gene. *Nature*. 1983; 14;306(5943):611-4.
- 66.- Horner KA, Zadina JE. Internalization and down-regulation of mu opioid receptors by endomorphins and morphine in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res*. 2004; 1028(2):121-32.
- 67.- Horton AC, Ehlers MD. Neuronal polarity and trafficking. *Neuron*. 2003 Oct 9;40(2):277-95.

- 68.- Hosohata K, Burkey TH, Alfaro-Lopez J, Varga E, Hruby VJ, Roeske WR, Yamamura HI. Endomorphin-1 and endomorphin-2 are partial agonists at the human mu-opioid receptor. *Eur J Pharmacol.* 1998;346(1):111-4.
- 69.- Hoyle CHV Neuropeptide families: evolutionary perspectives. *Regulatory Peptides.* 1998; 73: 1-33.
- 70.- Huang C, Wang Y, Chang JK, Han JS. Endomorphin and mu-opioid receptors in mouse brain mediate the analgesic effect induced by 2 Hz but not 100 Hz electroacupuncture stimulation. *Neurosci Lett.* 2000;294(3):159-62.
- 71.- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fotherhill LH, Morgan BA, Morris HR. Identification of two related pentapeptides from brain with potent opiate activity. *Nature (London)* 1975; 258: 577-579.
- 72.- Husi H, Grant SG. Proteomics of the nervous system. *Trends Neurosci.* 2001; 24(5):259-66.
- 73.- .Jiang Y, Klodesky CM, Chang SL. Endomorphin-1 and endomorphin-2 induce the expression of c-FOS immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res.* 2000;873(2):291-6.
- 74.- Kajimoto Y, Shirai Y, Mukai H, Kuno T, Tanaka C. Molecular cloning of two additional members of the neural visinin-like Ca(2+)-binding protein gene family. *J Neurochem.* 1993;61(3):1091-6.
- 75.- Kakidani H, Furutani Y, Takahashi H, Noda M, Morimoto Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Nakanishi S, Numa S. Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature.* 1982; 298(5871): 245-9.
- 76.- Kandel RE; Schwartz HJ, Jessell, MT. Neurotransmitters: In Principles in Neuroscience. (Kandel RE; Schwartz HJ, Jessell, MT,) 4th Edition. McGraw Hill Co. N.Y, 2000 pp, 280-298.
- 77.- Kasamatsu K, Sapru HN. Attenuation of aortic baroreflex responses by micro-injections of endomorphin-2 into the rostral ventrolateral medullary pressor area of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 ;289(1):R59-67.
- 78.- Kastin AJ. What is a neuropeptide. *Trends Neurosci.* 2000; 23(3): 113-4.
- 79.- Kato I, Yonekura H, Tajima M, Yanagi M, Yamamoto H, Okamoto H. Two enzymes concerned in peptide hormone alpha-amidation are synthesized from a single mRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 172 (1):197-203.

- 80.- Kiebler MA, DesGroseillers L. Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* 2000; 25(1):19-28.
- 81.- Kobayashi M, Sakai E, Furuta Y, Takamatsu K. Isolation of two human cDNAs, HLP3 and HLP4, homologous to the neuron-specific calcium-binding protein genes. *DNA Seq.* 1998; 9(3):171-6.
- 82.- Kobayashi M, Takamatsu K, Fujishiro M, Saitoh S, Noguchi T. Molecular cloning of a novel calcium-binding protein structurally related to hippocalcin from human brain and chromosomal mapping of its gene. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1222(3):515-8.
- 83.- Kobayashi M, Takamatsu K, Saitoh S, Miura M, Noguchi T. Molecular cloning of hippocalcin, a novel calcium-binding protein of the recoverin family exclusively expressed in hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 196(2): 1017.
- 84.- Kosterlitz HW, Corbett AD, Paterson SJ. Opioid receptors and ligands. *NIDA Res Monogr.* 1989; 95:159-66.
- 85.- Kuno T, Kajimoto Y, Hashimoto T, Mukai H, Shirai Y, Saheki S, Tanaka C. cDNA cloning of a neural visinin-like Ca(2+)-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 184(3): 1219-25.
- 86.- Kwok EH, Dun NJ. Endomorphins decrease heart rate and blood pressure possibly by activating vagal afferents in anesthetized rats. *Brain Res.* 1998; 803(1-2): 204-7.
- 87.- Ladant D. Calcium and membrane binding properties of bovine neurocalcin delta expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1995;270(7):3179-85.
- 88.- Lazarus LH, Bryant SD, Salvadori S, Attila M, Sargent Jones L. Opioid infidelity: novel opioid peptides with dual high affinity for delta- and mu-receptors. *Trends Neurosci.* 1996; 19(1):31-5.
- 89.- Leeman SE, Mroz EA and Carraway R. Substance P and neurotensin. In H. Gainer(ed), *peptides in Neurobiology*. New York: Plenum, 1977, pp: 99-144.
- 90.- Leeman SE, Mroz EA. Substance P. *Life Sci.* 1975; 15(12): 2033-44.
- 91.- Lenz SE, Branunewell KH, Weise C, Nedlina-Chittka A, Gundelfinger ED. The neuronal EF-hand Ca<sup>2+</sup>-binding protein VI.LIP: interaction with cell membrane and actin-based cytoskeleton. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1996; 225. 1078-1083.

- 92.- Lenz SE, Henschel Y, Zopf D, Voss B, Gundelfinger ED. VILIP, a cognate protein of the retinal calcium binding proteins visinin and recoverin, is expressed in the developing chicken brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 1992; 15(1-2): 133-40.
- 93.- Lewin B. Proteins and mRNA, In: *Genes VII*. (Lewin B, ed) 1<sup>st</sup> Edition, Oxford University Press, 2000, pp 117-346.
- 94.- Li Ch, Chung D. Isolation and structure of an untrikontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1976; 76: 1145-8.
- 95.- Lin L, Braunewell KH, Gundelfinger ED, Anand R. Functional analysis of calcium-binding EF-hand motifs of visinin-like protein-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 296(4):827-32.(A)
- 96.- Liston DR, Vanderhaeghen JJ, Rossier J. Presence in brain of synenkephalin, a proenkephalin-immunoreactive protein which does not contain enkephalin. *Nature*. 1983; 302: 62-65.
- 97.- Lundberg JM, Terenius L, Hokfelt T, Goldstein M. High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. *Neurosci Lett*. 1983; 42(2):167-72.
- 98.- Mains RE, Eipper BA. Peptides. In *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*, 6<sup>th</sup> edition (Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SM, Uhler MD, eds.) Linpocott-Raven Press, N.Y. 1999; pp, 363-382.
- 99.- Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Zadina JE. Differential distribution of endomorphin 1- and endomorphin 2-like immunoreactivities in the CNS of the rodent. *J Comp Neurol*. 1999; 405(4):450-71.
- 100.- Mathisen PM, Johnson JM, Kawczak JA, Tuohy VK. Visinin-like protein (VILIP) is a neuron-specific calcium-dependent double-stranded RNA-binding protein. *J Biol Chem*. 1999; 274(44):31571-6.
- 101.- Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B, et al. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature*. 1995; 377(6549):476.
- 102.- Mizoguchi H, Tseng LF, Suzuki T, Sora I, Narita M. Differential mechanism of G-protein activation induced by endogenous mu-opioid peptides, endomorphin and beta-endorphin. *Jpn J Pharmacol*. 2002; 89(3):229-34.

- 103.- Mohr E, Kachele I, Mullin C, Richter D. Rat vasopressin mRNA: a model system to characterize cis-acting elements and trans-acting factors involved in dendritic mRNA sorting. *Prog Brain Res* 2002;139: 211-24.
- 104.- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.* 1994 Mar 14;341(1):33-8.
- 105.- Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang AC, Cohen SN, Numa S. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature.* 1979 Mar; 278(5703):423-7.
- 106.- Noda M, Furutani Y, Takahashi H, Toyosato M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S, Numa S. Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature.* 1982; 295(5846): 202-6.
- 107.- Nothacker HP, Reinscheid RK, Mansour A, Henningsen RA, Ardati A, Monsma FJ Jr, Watson SJ, Civelli O. Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(16):8677-82.
- 108.- Ohya S, Horowitz B. Differential transcriptional expression of Ca<sup>2+</sup> BP superfamilies in murine gastrointestinal smooth muscles. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002; 283(6):G1290-7.
- 109.- Okazaki K, Watanabe M, Ando Y, Hagiwara M, Terasawa M, Hidaka H. Full sequence of neurocalcin, a novel calcium-binding protein abundant in central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;185(1):147-53.
- 110.- Okuda-Ashitaka E, Ito S. Nocistatin: a novel neuropeptide encoded by the gene for the nociceptin/orphanin FQ precursor. *Peptides.* 2000;21(7):1101-9.
- 111.- Okuda-Ashitaka E, Minami T, Tachibana S, Yoshihara Y, Nishiuchi Y, Kimura T, Ito S. Nocistatin, a peptide that blocks nociceptin action in pain transmission. *Nature.* 1998; 392(6673):286-9.
- 112.- Ono JK, McCaman RE. In situ hybridization of whole-mounts of Aplysia ganglia using non-radioactive probes. : *J Neurosci Methods.* 1992; 44(1):71-9.
- 113.- Orito A, Kumanogoh H, Yasaka K, Sokawa J, Hidaka H, Sokawa Y, Maekawa S. Calcium –dependent association of annexin VI, protein kinase C alpha, and neurocalcin alpha on the raft fraction derived from the synaptic plasma membrane of the rat brain . *J Neurosci Res* 200; 64:235-241.

- 114.- Parmer RJ, Mahata M, Gong Y, Mahata SK, Jiang Q, O'Connor DT, Xi XP, Miles LA. Processing of chromogranin A by plasmin provides a novel mechanism for regulating catecholamine secretion. *J Clin Invest.* 2000; 106(7):907-15.
- 115.- Payne WJ Jr, Marshall DL, Shockley RK, Martin WJ. Clinical laboratory applications of monoclonal antibodies. *Clin Microbiol Rev.* 1988 Jul;1(3):313-29. Review.
- 116.- Pert CB, Snyder SH. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science.* 1973; 179(77):1011-4.
- 117.- Polymeropoulos MH, Ide S, Soares MB, Lennon GG. Sequence characterization and genetic mapping of the human VSNL1 gene, a homologue of the rat visinin-like peptide RNVP1. *Genomics.* 1995; 29(1):273-5.
- 118.- Przewlocka B, Mika J, Labuz D, Toth G, Przewlocki R. Spinal analgesic action of endomorphins in acute, inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol.* 1999;367(2-3):189-96.
- 119.- Ramstrom M, Hagman C, Tsybin YO, Markides KE, Hakansson P, Salehi A, Lundquist I, Hakanson R, Bergquist J. A novel mass spectrometric approach to the analysis of hormonal peptides in extracts of mouse pancreatic islets. *Eur J Biochem.* 2003; 270(15):3146-52.
- 120.- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T. Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 1994; 45(2): 330-4.
- 121.- Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ Jr, Civelli O. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid-like G protein-coupled receptor. *Science.* 1995; 270(5237):792-4.
- 122.- Sakurada S, Watanabe H, Hayashi T, Yuhki M, Fujimura T, Murayama K, Sakurada C, Sakurada T. Endomorphin analogues containing D-Pro2 discriminate different mu-opioid receptor mediated antinociception in mice. *Br J Pharmacol.* 2002; 137(8):1143-6.
- 123.- Salzet M, Vieau D, Day R. Crosstalk between nervous and immune systems through the animal kingdom: focus on opioids. *Trends Neurosci.* 2000; 23 (11):550-5.
- 124.- Sambrook J, Russell. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York. 2001.

- 125.- Sánchez-Islas E, Ridaura C, Acevedo R, Morales A, Calva JC, Valdez A, León-Olea M, Leff P, Antón B. Comparative immunohistochemistry for endomorphins and mu opioid receptor in the human pons-medulla and spinal cord. 30th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Neurosci Abstr 30(1): 634. 2000.
- 126.- Seidah NG, Day R, Marcinkiewicz M, Chretien M. Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. Ann N Y Acad Sci. 1998 May 15;839:9-24.
- 127.- Sigafos J, Chestnut WG, Merrill BM, Taylor LC, Diliberto EJ Jr, Viveros OH. Novel peptides from adrenomedullary chromaffin vesicles. J Anat. 1993;183 ( Pt 2):253-64.
- 128.- Silverman MB, Hermes SM, Zadina JE, Aicher SA. Mu-opioid receptor is present in dendritic targets of Endomorphin-2 axon terminals in the nuclei of the solitary tract. Neuroscience 2005; 135(3):887-96.
- 129.- Simpson PB, Challiss RA, Nahorski SR. Neuronal Ca<sup>2+</sup> stores: activation and function. Trends Neurosci. 1995; 18(7):299-306.
- 130.- Smith AP, Lee NM. Opioid receptor interactions: local and nonlocal, symmetric and asymmetric, physical and functional. Life Sci. 2003; 73(15): 1873-93.
- 131.- Soignier RD, Vaccarino AL, Brennan AM, Kastin AJ, Zadina JE. Analgesic effects of endomorphin-1 and endomorphin-2 in the formalin test in mice. Life Sci. 2000 ;67(8):907-12.
- 132.- Sossin WS, Fisher JM, Scheller RH. Cellular and molecular biology of neuropeptide processing and packaging. Neuron. 1989; 2(5):1407-17.
- 133.- Spilker C, Dresbach T, Braunewell KH. Reversible translocation and activity-dependent localization of the calcium-myristoyl switch protein VILIP-1 to different membrane compartments in living hippocampal neurons. J Neurosci 2002; 22(17): 7331-9.
- 134.- Stefano GB, Salzet M. Invertebrate opioid precursors: evolutionary conservation and the significance of enzymatic processing. Int Rev Cytol 1999; 187:261-86.
- 135.- Steiner DF. The proprotein convertases. Curr Opin Chem Biol. 1998; 2(1):31-9.
- 136.- Strand FL. New vistas for melanocortins. Finally, an explanation for their pleiotropic functions. Ann N Y Acad Sci. 1999; 897:1-16.

- 137.- Tao PL, Lai YS, Chow LH, Huang EY. Effects of morphine and endomorphins on the polysynaptic reflex in the isolated rat spinal cord. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2005 ;371(1):72-80.
- 138.- Tatemoto K Isolation and characterization of peptide YY (PYY), a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982; 79(8):2514-8.
- 139.- Taupenot L, Remacle JE, Helle KB, Aunis D, Bader MF. Recombinant human chromogranin A: expression, purification and characterization of the N-terminal derived peptides. *Regul Pept.* 1995; 56(1):71-88.
- 140.- Terenius L. Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 1973; 33(5):377-84.
- 141.- Tracy HJ, Gregory RA. Physiological properties of a series of synthetic peptides structurally related to gastrin I. *Nature;* 1964; 204:935-8.
- 142.- Ukai M, Watanabe Y, Kameyama T. Endomorphins 1 and 2, endogenous mu-opioid receptor agonists, impair passive avoidance learning in mice. *Eur J Pharmacol* 2001; 421(2): 115-9.
- 143.- Ukena K, Iwakoshi E, Minakata H, Tsutsui K. A novel rat hypothalamic RFamide-related peptide identified by immunoaffinity chromatography and mass spectrometry. *FEBS Lett.* 2002; 512(1-3):255-8.
- 144.- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, y col., The sequence of the human genome. *Science.* 2001 Feb 16;291(5507):1304-51. Erratum in: *Science* 2001; 292(5523):1838.
- 145.- Vitorino R, Lobo MJ, Duarte JA, Ferrer-Correia AJ, Domingues PM, Amado FM. Analysis of salivary peptides using HPLC-electrospray mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 2004; 18(8):570-5.
- 146.- Walter P, Blobel G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol.* 1981 Nov;91(2 Pt 1): 551-6.
- 147.- Wang CL, Yu Y, Lai LH, Cui Y, Wang X, Wang R. Cardiovascular responses to intrathecal administration of endomorphins in anesthetized rats. *Peptides.* 2007; 28(4):871-7.



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

---

- 148.- Wang, Q.P., Zadina, J.E., Guan, J.L., Kastin, A.J., Shioda, S., Electron microscopic examination of the endomorphin 2-like immunoreactive neurons in the rat hypothalamus. *Brain Res* 2003; 969 (1-2): 126-34.
- 149.- Yahalom D, Chen A, Ben-Aroya N, Rahimipour S, Kaganovsky E, Okon E, Fridkin M, Koch Y. The gonadotropin-releasing hormone family of neuropeptides in the brain of human, bovine and rat: identification of a third isoform. *FEBS Lett.* 1999; 463(3): 289-94.
- 150.- Yu WH, Karanth S, Walczewska A, Sower SA, McCann SM. A hypothalamic follicle-stimulating hormone-releasing decapeptide in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(17): 9499-503.
- 151.- Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature.* 1997; 386(6624):499-502.
- 152.- Zadina JE, Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Hackler L, Ge LJ, Zhang X. Endomorphins: novel endogenous mu-opiate receptor agonists in regions of high mu-opiate receptor density. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 897:136-44.
- 153.- Zigmond R, Mohny R, Schreiber R, Shadiack A, Sun Y, Vaccariello YS, Zhou Y. Changes in gene expression in adult sympathetic neurons after axonal injury. *Adv Pharmacol.* 1998; 42:899-903.



MANUSCRITO DEL ARTICULO DE TESIS PARA SU PUBLICACIÓN EN  
REVISTA NEUROPEPTIDES 2008.

Benito Antón, Philippe Leff, Juan C. Calva, Rodolfo Acevedo, Aline Morales, Maura Matus , Norma E. Herrera G , Lenin Pavón , Alberto Salazar , Guillermo Matamorros, , Paola Vergara , Jose Segovia , Miguel Asai. CHARACTERIZATION OF ENDOMORPHIN-1-2-LIKE IMMUNOREACTIVITY THE RAT CENTRAL NERVOUS SYSTEM: SEARCH FOR ENDOGENOUS PROPEPTIDE PRECURSOR PROTEIN(S) OF ENDOMORPHIN MOLECULES. *Neuropeptides* 2008 (paper under review by Antón, 2008).

**CHARACTERIZATION OF ENDOMORPHIN-1-2-LIKE IMMUNOREACTIVITY  
IN THE RAT CENTRAL NERVOUS SYSTEM: SEARCH FOR ENDOGENOUS  
PROPEPTIDE PRECURSOR OF ENDOMORPHIN PEPTIDES**

**MANUSCRIPT PREPARED FOR ITS SUBMISSION TO NEUROPEPTIDES 2008**

**AUTHORS:** Benito Antón<sup>a\*</sup>, Philippe Leff<sup>a</sup>, Juan C. Calva<sup>a</sup>, Rodolfo Acevedo<sup>a</sup>, Aline Morales<sup>a</sup>, Maura Matus<sup>a</sup>, Norma E. Herrera G<sup>d</sup>, Lenin Pavón<sup>e</sup>, Alberto Salazar<sup>a</sup>, Guillermo Matamorros<sup>b</sup>, Paola Vergara<sup>c</sup>, Jose Segovia<sup>c</sup>, Miguel Asai<sup>b</sup>.

<sup>a</sup> Laboratorio de Neurobiología Molecular y Neuroquímica de Adicciones. Instituto Nacional de Psiquiatría, Ramón de la Fuente Muñiz. Calzada México-Xochimilco No.101, C.P. 14370 México D.F.

<sup>b</sup> Laboratorio de Análisis Químico. Instituto Nacional de Psiquiatría, Ramón de la Fuente Muñiz. Calzada México-Xochimilco 101. C.P. 14370 México D.F.

<sup>c</sup> Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias. CINVESTAV. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, C.P. 07000 México D.F.

<sup>d</sup> Laboratorio de Ontología Molecular. Escuela Superior de Medicina. Instituto Politécnico Nacional. Plan de San Luis y Díaz Mirón, C.P. 11340 México D.F.

<sup>e</sup> Laboratorio de Psiconeuroinmunología. Instituto Nacional de Psiquiatría, Ramón de la Fuente Muñiz. Calzada México-Xochimilco No. 101, C.P. 14370 México D.F.

**Corresponding author:** Benito Antón M.D. Ph.D.

**E-mail address:** [antonpb@imp.edu.mx](mailto:antonpb@imp.edu.mx)

## **Abstract**

Endomorphin-1 (EM-1) and endomorphin-2 (EM-2) are the latest opioid peptide ligands discovered in the CNS of mammals that display the highest affinity and selectivity for the mu opiate receptor. EM1-2 display several, pharmacological physiological, behavioral cellular and molecular bioactivities shared by opiate alkaloids and its immunoreactivity shown to be distributed in spinal and supraspinal areas of the rat CNS that mediate pain transmission and analgesia and co-localized with MOR. . These findings support the endogenous role of these amide tetrapeptides as active neuromodulators in CNS of mammals. However, no data have been reported regarding the identification and characterization of peptide precursor(s) coding these two molecules as shown for other endogenous opioid substances. With the aim to search for the existence of such putative precursor(s) protein(s), two-antigen affinity purified antisera (A-APA) were generated against synthetic EM-1 and EM-2 peptides and their specificity and selectivity validated by a fmol sensitive-solid-phase RIA (SP-RIA) assays, respectively. Western-blot and gel permeation chromatography (coupled to SP-RIA for EM-1) assays were used to detect EM1-2-immunoreactivity (IR) in neuronal and non-neuronal tissues of the rat, including superfusates from depolarized rat striatum with 50 mM KCl. Distribution and cellular expression of EM1-2-IR were assessed by immunohistochemical mapping of representative rostral-caudal areas of the rat CNS. Our results show that both A-APA for EM-1 (C-14) and EM-2 (C-16) were highly specific when reacting against synthetic EM1-2 peptides and capable to detect EM1-2-IR in high and low molecular mass protein/peptide components (> 15 kDa, < 77 kDa) in rat neural tissues as revealed in western blot and chromatography assays. Chromatography profile of eluted superfusates samples revealed the presence of two-IR-peptide peaks of low-molecular weight ( $\approx$  0.7-0.6 kDa) that cross-matched with synthetic EM-1 in RP-HPLC. Both C-14/C-16 A-APA showed the wide distribution of EM-IR in extensive neuropil, varicose and fine-axon fibers, round and oval-shaped somata of different neurons within the rat CNS. These studies provide the first immunochemical evidence of the biosynthetic origin of endomorphin molecules from putative non-identified specific propeptide precursor(s) in neurons; showing the great versatility and applicability of both EM1-2 antisera in different immunochemical techniques .

**Keywords:** endomorphin, propeptide, precursor, protein, antibodies, immunoreactivity, striatum, chromatography, depolarization, immunohistochemistry.

## 1. INTRODUCTION

Four major families of endogenous opioid peptides were identified in the past 30 years, namely, endorphins (Li and Chung, 1976; Bradbury et al., 1976) enkephalins (Hughes et al., 1975) and dynorphins (Goldstein et al., 1979; Chavkin et al., 1982) which display a common N-terminus amino acid motif of YGGF and nociceptin/OFQ peptide which contain a N-terminus amino acid motif of FGGF (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995) .

Both enkephalins, dynorphins and nociceptin/OFQ peptide display medium to high binding affinities ( $K_i < 1.0$  nM) to their preferential cognate G-protein coupled opioid receptors (e.g.,  $\delta$ -opioid receptor,  $\kappa$ -opioid receptor and the ORL-1 opioid receptor, respectively) (Corbett et al., 1993) whereas endorphin peptides (i.e.,  $\beta$ -endorphin) possess a low binding affinity for the mu opioid receptor ( $K_i \leq 4.5$  nM) (Raynor et al., 1994; Corbett et al., 1993) when compared to the high binding affinity of DAMGO ( $K_D < 0.4$  nM) (Zadina et al., 1997).

In search for endogenous mu-opioid receptor peptide ligands, two amide tetrapeptides named, endomorphin-1 [Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>] and endomorphin-2 [Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>] were isolated from the bovine (Zadina et al., 1997) and human brain (Hackler et al., 1997) which displayed the highest affinity and selectivity for this opioid receptor subtype when compared to different opioid substances (Goldberg et al., 1998; Hosohata et al., 1998; Zadina et al., 1997). Cellular studies have shown that binding of endomorphins to mu opiate receptors leads to activation G proteins (Monory et al., 2000; Mizoguchi et al., 1999; Sanchez-Blazquez et al., 1999) regulation of adenylyl cyclase isoenzymes (Nevo et al., 2000) inhibition of calcium-channel currents (Higashida et al., 1998) activation of inward K<sup>+</sup> currents (Gong et al., 1998) and modulation of MOR mRNA expression and MOR function in SHSY-5Y cells (Yu et al., 2003). These peptides produced many physiological and pharmacological activities normally attributed to opiate alkaloids, such as antinociception (Sakurada et al., 2002; Soignier et al., 2000; Huang et al., 1998; Przelowcka et al., 1999; Zadina et al., 1997) feeding responses and oxygen consumption (Asakawa et al., 1998) vasodepressor activity and cardiorespiratory (Champion et al., 2002; Czapla et al., 2000; Kwok and Dun, 1998) neuroendocrine modulation (Bujdoso et al., 2003; Coventry et al., 2001; Doi et al., 2001) including learning and memory behavioral responses (Ukai et al., 2001) and immune regulation (Azuma et al., 2002).

Identification of endomorphin molecules in the brain was achieved by generation of specific rabbit antibodies against the tetrapeptide sequences of EM-1 (Phe-4 peptide) and used to develop a sensitive and specific RIA (1 pg of peptide) able to screen endomorphin immunoreactive material in HPLC fractions from bovine cortical brain extracts (Zadina et al., 1997). Moreover, polyclonal antisera against both tetrapeptides, led to identification of the anatomical distribution endomorphin-1-2-like immunoreactivity in the CNS of the rat (Wang et al., 2003; Pierce et al., 2000; Martin-Schild et al., 1999) primate (Pierce et al., 1998) and hamster

(Whitten et al., 2001) showing that endomorphin material contained within large-dense core vesicles [LDCV] in fibers and axon terminals (Wang et al., 2002; Abbadie et al., 2002; Schreff et al., 2004) of trigeminal dorsal horn neurons (Aicher et al., 2003; Bruggemann et al., 2000; Ding et al., 1995; Honda et al., 1995) exhibit a high degree of co-localization of MOR-LI in several regions of the rat brain (Mansour et al., 1995). These results support the wide functional roles displayed of these amide tetrapeptides, which lead to their categorization as a novel family of functional endogenous opioid compounds in the CNS of mammals that exhibit a wide variety of central modulatory activities (Zadina, 2002, 1999; Higashida et al., 1998). Moreover, the categorization as endogenous opioid peptides may be supported by recent studies showing the evoked-dependent release of EM2-IR from dorsal horn neurons (as detected by an immobilized antibody microprobe technique) after dorsal root afferent stimulation (Dun et al., 2000), suggesting the endogenous origin of these amide tetrapeptides in the CNS (Zadina et al., 1999).

Despite of the aforementioned studies showing the wide role of activities displayed by endomorphin molecules and their labelling pattern within the CNS; no data have been reported yet on the identification and characterization of a neuronal propeptide precursor(s) protein(s), encoding active sequences of endomorphin molecules, which could support the endogenous neuronal origin of these amide tetrapeptides.

In order to address this latter question, we undertook an initial approach to explore for the existence of putative precursor protein(s) for endomorphins in the rat brain, by generating two specific antigen-affinity purified antisera (AAP-A) generated for both EM-1 and EM-2 peptides. Each antiserum showed to be highly specific and selective for detecting the consensus peptide motifs of EM-1 and EM-2, respectively in different standard immunoenzymatic assays and specific RIA generated for each endomorphin peptide, which were used used to screen endomorphin immunoreactivity in protein material extracted from different regions of the rat brain; in HPLC fractions of collected superfusates from  $K^+$ -stimulated brain tissue; and in immunohistochemical assays used to characterize the anatomical distribution and cellular expression of endomorphin material in the rat brain.

Thus, the present paper describes the generation and validation of two highly specific antigen-affinity purified EM antisera that display a great sensitivity and selectivity in detecting endomorphin-like immunoreactive material in high-to-low molecular mass protein material from different neural areas of the rat brain, as well as endomorphin-immunoreactivity released from  $K^+$ -stimulated neurons. These studies provide the first approach for searching large propeptide precursor(s) proteins of endomorphin molecules using antibody-based screening methodologies, which support the endogenous and neuronal origin of these amide tetrapeptides, putatively encoded in a non-identified large propeptide precursor(s) protein(s) in the SNC of mammals.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Synthesis of Peptides.**

The Peptide Chemical Synthesis Program of the National Institute of Mental Health (Bethesda, MD) generously donated the synthetic endomorphin-1 (EM-1) and endomorphin-2 (EM-2) to our laboratory. Synthetic EM-1-2 was supplied as a peptide free base of trifluoroacetate salt 98% purity. The peptide sequence of Mexneurin-1 (Mx-1)—TFSGYPAF— and the peptide fragment —YVKFFPYGDA— referred to as, Y-8-A peptide, were custom-made synthesized by Phoenix Pharmaceuticals, USA.

Mexneurin-1 (Mx-1) represents a novel bioactive non-amidated opioid peptide encoded by the 1083 bp Mexneurin precursor mRNA and cloned from a whole mouse brain cDNA expression library (Stratagene) (Anton et al., 2004; *Mus musculus* Mexneurin precursor mRNA, complete cds; Genbank; LOCUS AY142705, GI: 34850572). Mx-1 represents the H<sub>2</sub>N-terminal peptide along the 91 aa —Mexneurin propeptide precursor—. The C-terminus domain of the Mx-1 peptide, expresses an EM1-2-like peptide sequence motif that appears to confer its high binding affinity profile for MOR (i.e., K<sub>i</sub>= 0.7-1 nM); its high capability in stimulating [<sup>35</sup>S]GTP- $\gamma$ -S binding on MOR; its potent endocytic activity of MOR on CHO cells; its prolonged and potent antinociceptive activity after IT injection of peptide into mice; a potent dose-response inhibition of the spontaneous firing rate on cortical and hypothalamic neurons; suggesting thus, its putative endogenous opioid role, as a full agonist of MOR (Antón et al., 2004; Leff et al., 2005).

Y-8-A peptide fragment represents an H<sub>2</sub>N-terminal peptide sequence motif found in most neuronal calcium sensor proteins (NCSPs) (Spilker et al., 2002; Braunewell and Gundelfinger, 1999) and the Visinin-like protein-1 (Mathisen et al., 1999). This peptide fragment encodes the inverted peptide sequence motif of EM-2 —FFPY— along the 191 aa protein product of the Visinin-like protein-1 mRNA transcript (Antón et al., 2002); previously identified and cloned from a whole mouse brain cDNA expression library (Stratagene) (Matus et al., 2002; *Mus musculus* visinin-like protein-1 mRNA, complete cds; . ACCESSION AY101375, GI: 2139236) .

### **2.3 Preparation of immunogens and generation of rabbit peptide antisera against EM-1 and EM-2.**

Immunogens were prepared according to standard protocols (Harlow & Lane, 1999). A typical reaction for peptide conjugation consisted of a solution of 5 mg/ml of either synthetic EM-1 or EM-2 dissolved in 1 ml of 10 mM phosphate-buffered 0.9% saline, pH 7.2. Synthetic haptens were covalently conjugated to 50 mg of keyhole limpet hemocyanin (KLH, Sigma) using a final



concentration of 0.2 % of glutaraldehyde (Sigma). After one hour of incubation at room temperature, the cross-linking reactions were stopped by adding to immunogens a solution of 0.1 M of glycine, pH 8. The conjugates were subsequently dialyzed for 48 h in PBS to remove unreactive aldehydes. After dialysis, immunogens were diluted with PBS to the equivalent of 1 mg/ml of both endomorphin conjugates, frozen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until required. Antisera for both EM-1 and EM-2 were raised in six female New Zealand white rabbits (2 kg) using standard immunization protocols (Harlow and Lane, 1999). Briefly, animals received a primary boost with a subcutaneous injection of 2 ml of a 1:1 emulsion of 1mg/ml PBS of conjugate: Freund's complete adjuvant (Sigma). The subsequent boosts (four per animal) were carried out at 1-month interval over a period of a year using 1 ml of a 1:1 emulsion of 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PBS of conjugate: Freund's incomplete adjuvant (Sigma). Rabbits were invariably bled from the ear's marginal vein every two weeks after the most recent immunization, the collected blood centrifuged at 3000 rpm at  $4^{\circ}\text{C}$  and sera stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Antibody titer for EM-1–2 after each boost were monitored by a standard solid phase antibody capture ELISA assay (Hockfield et al., 1993) using 96-well ELISA plates (Immunolon I, Corning) coated with 0.5  $\mu\text{g}/\text{well}$  of each synthetic antigen peptide. Serum from the R-14 rabbit immunized with the EM-1 immunogen as well as from the R-16 rabbit immunized with EM-2 immunogen showed high titers ( $\geq 1:500,000$ ) for the recognition of EM-1 (YPWF-NH<sub>2</sub>) and EM-2 (YPPF-NH<sub>2</sub>), respectively (data not shown). Chromatographic fractions of antigen affinity-purified antisera (A-APA) were prepared according to standard protocols (Harlow and Lane, 1999) using synthetic EM-1-2 as coupled antigens to an epoxy-activated Sepharose 6B resin (Pharmacia). Recovery of specific antibodies from chromatographic immunopurifications was routinely verified by standard ELISA assays, using synthetic peptides of both EM-1 and EM-2 molecules.

#### **2.4 Immunopurification of whole reactive sera for EM-1 and EM-2.**

Chromatographic fractions of antigen affinity-purified antisera (A-APA) were prepared according to a standard protocol (Harlow and Lane, 1999) using either synthetic EM-1 or EM-2 as coupled antigens to epoxy-activated Sepharose 6B resin (Pharmacia). Covalent coupling of synthetic antigens to the activated resin was carried out according to a standard protocol recommended by the resin's manufacturer. For coupling, 2.5 mg of either synthetic EM-1 or EM-2 were dissolved in 10 ml of 0.1 M of sodium carbonate and incubated for 24 h at  $4^{\circ}\text{C}$  with 5 ml of drained Sepharose 6B resin. After coupling, the peptide-resin fraction was dialyzed for 48 h at  $4^{\circ}\text{C}$  against 0.1 M PBS, pH 7.4. For chromatographic purification, fractions of 5ml from whole reactive sera were diluted with 45 ml of 10 mM tris-HCl, pH 7.5 and subsequently eluted six times through columns packed with the peptide-resin solid phase. Peptide-bound antibodies were recovered from the columns' solid phase using five gel bed volumes of a solution containing 3 M of potassium thiocyanate/50 mM tris-HCl, pH 8. After elution, specific antibodies for either EM-1 or

EM-2 were extensively dialyzed against PBS for 48 h at 4°C, stabilized with 1% BSA (fraction V, protease free, Sigma) and stored at -20 °C until required. Recovery of antibodies specific from chromatographic purification was verified by standard ELISA assay.

## **2.5 Solid-phase RIA.**

Solid-phase radioimmunoassay for EM-1-2 was carried out according to standard procedures as described previously (Hockfield et al., 1993). Briefly, synthetic EM-1, iodinated via the chloramine-T method was purified by HPLC using Hypersil wide-pore 5- $\mu$ m, C-8 /2 x 150 mm columns. The solid phase of the assay was prepared by adding a 100  $\mu$ l solution containing 500 ng protein-A (SIGMA)/ 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9, to immunolon II-removable wells (VWR) and washed out with RIA buffer (0.15 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% Tween-20, 0.1% gelatin, pH 7.5). Treated wells were exposed to 2 h incubation at with 50- $\mu$ l solutions of RIA buffer containing a 1:30 dilution of C-14 A-APA, or 1:20 dilution of C-16 A-APA (these dilutions were determined previously to provide approximately 20-30 % binding). After dumping the antibody solution and wells washed with RIA buffer, 50  $\mu$ l RIA buffer containing samples and standards (tracer plus competitive peptides, 0.1-fmol-1nmol/well, in quadruplets) were pre-incubated with adsorbed antibody for 2 h at room temperature. Typical standard curve used [<sup>125</sup>I]-EM-1 as tracer plus non-labeled EM-1 and Mexneurin-1 (Mx-1) and the peptide construct Y-8-A as competitive peptides in RIAs using EM-1 as tracer. After pre-incubation of standards, 25  $\mu$ l RIA buffer containing approximately 5000 c.p.m. [<sup>125</sup>I]-EM-1 was added to each well and plates were incubated overnight at 4°C. Treated wells were washed-out and counted for 4 min in a ten-channel gamma counter, ISO DATA 500.

## **2.6 Endomorphin immunoreactivity: Western blot**

Gel electrophoresis and western blot analyses of protein extracts of the rat brain were performed according to standard blotting procedures as previously described (Segovia et al, 1998) with mild modifications. Briefly, denatured protein samples (50  $\mu$ g per lane) extracted from different regions of the rat brain, adrenal and non-neuronal tissues (lung and heart) were separated on 8% SDS-PAGE gels. Resolved proteins were then blotted onto PVDF membranes (0.45  $\mu$ m, Bio-Rad) in a buffer containing 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 20% (v/v) methanol, using a semi-dry transfer system. Membranes were blocked for 1 hr at room temperature in PBS pH 7.4, 0.05% Tween-20 (Sigma) with 5% skim milk, 2% normal goat serum (Vector), 3% bovine albumin (Sigma), washed and incubated overnight at 4°C in the presence of either R-14 or C-16 A-APA, each one diluted 1:40. Membranes were washed again, and incubated in the presence of the secondary antibody, diluted 1:6000 (Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit, Zymed). Proteins were revealed using an enhanced chemiluminescence kit, according to the manufacturer's instructions (ECL detection system, NEN Life Sciences Products), and observed

on X-OMAT films (Kodak). Control of gel electrophoresis and western blotting were assessed by blotting same protein samples from the rat brain into PVDF membranes and stripped membranes were reprobated with a monoclonal antibody against actin, as described in Garcia-Tovar et al, 2001 and Segovia et al, 1998.

### **2.7 Tissue dissection and preparation of a whole peptide fraction from rat striatum.**

10 g of rat striatum were dissected, boiled in 10 vol of 0.1 N HCl for 15 min, homogenized with a tissue homogenizer (Polytron PT10/35) and centrifuged at 50,000 x g for 1 h., and supernatant were then kept frozen overnight. Thawed supernatants were loaded to Amberlite XAD-2 columns (SIGMA) to allow solid-phase peptide extraction. The whole peptide fraction was then eluted with 50 % methanol, dried, and finally resuspended with RIA buffer.

### **2.8 Gel filtration chromatography of peptide fractions and superfusates.**

Peptide fractions from either tissue homogenates or in vitro superfusates from rat striatum were run through a Sephadex G-50 column (120 x 1 cm) (Pharmacia Inc, USA) equilibrated with 1 M acetic acid (pH 1.9). Elution of peptide fractions was carried out at a flow rate of 12 ml/h at 4 °C. Four milliliter fractions were collected, lyophilized and reconstituted in 50 mM Tris-HCl, pH 8.4/ 2 mM CaCl<sub>2</sub>. EM1-2-IR was assayed either prior and after enzymatic digestion with trypsin and carboxipeptidase B (SIGMA). Calibrating markers used to assess the elution profile of detected IR-peptide components were: Vo= Blue dextran 2000; Chymotrypsinogen A, 25 kDa; Ribonuclease A, 13.7 kDa; Insuline, 5.6 kDa; [Tyr63]-Synenkephalin 63-70, 1 kDa; Met-enkephalin, 0.5 kDa.

### **2.9 In vitro perfusion of rat striatal slices.**

Preparation of rat brain slices and in vitro perfusion of neural tissue were performed according to standard procedures previously reported (Glowinsky and Iversen, 1966; Engel and Sharpless, 1977). Briefly, brains from eight rats were rapidly removed and right and left striatum were dissected and sliced in two directions at 90° at 300 µm with a tissue chopper. Slices were incubated at 37°C for 15 min in 25 ml of Krebs-bicarbonate buffer plus 1 µM Phe-Ala saturated with a mixture of 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub> and placed into plastic superfusion chambers and perfused with oxygenated Krebs's medium at a flow rate of 1 ml/min. After a preliminary wash period of 15 min, slices were perfused for an additional 20 min period before to change to perfusion for 10 min with a medium containing 55 mM KCL. Perfusates of 10 ml were collected at 10 min intervals in siliconized glass tubes containing 1ml 1N HCl and then boiled in 10 vol of acetic acid (pH 1.9). Samples were purified through Amberlite XAD-2, lyophilized, and resuspended in RIA buffer.

### **2.10 HPLC procedures.**

Collected superfusates from depolarized rat striatum were subjected to a pre-purification step through Amberlite XAD-2, lyophilized and resuspended in 10% acetonitrile/0.1% TFA. Samples

were applied to a reverse-phase column (Bondapak C-18, 4  $\mu$ m, 3.9 x 300 mm) (Waters Inc) and the elution of peptides was carried out in a discontinuous acetonitrile gradient (10-90%). The flow rate was held constant at 1 ml/min and fractions of 1ml were collected. Aliquots were dried and resuspended in RIA buffer. To identify the nature of the immunoreactive material being detected, an additional reverse-phase high-performance liquid chromatography was performed with synthetic EM-1 to demonstrate co-elution with synthetic EM-1 using the same chromatographic conditions.

### **2.11 Animals and tissue preparation**

Tissue preparation for immunohistochemical detection of endomorphin-like immunoreactivity was performed following standard procedures as previously described (Anton et al., 1996). Briefly, six Wistar male rats (250-300 g) were anesthetized with ketamine (0.2 mg/kg, I.P) and transcardially perfused with 1 liter of 4 % paraformaldehyde/ 1% picric acid/PBS, pH 7.4. Brains were post-fixed in 4% with paraformaldehyde for 3 h. The fixed tissue was cryoprotected in 30 % sucrose/ PBS (pH 7.4) solution for 3 days at 4  $^{\circ}$ C. The tissue was cut into either frontal or sagittal 40  $\mu$ m thick sections on a cryostat (Reichert-Jung 3050). Sliced sections were collected in 24-well plates, free-floated in PBS/0.2 % sodium azyde solution and stored at 4  $^{\circ}$ C until use. Storage up to 1 month in the aforementioned solution does not result in loss of immunoreactivity (Anton et al., 1996).

### **2.12 Immunohistochemistry**

Immunohistochemistry for endomorphin immunoreactivity was performed according to standard procedures described elsewhere (Anton et al., 1996, Martin-Schild et al., 1999; Whitten et al., 2001) with minor changes. Briefly, tissue sections were processed free-floating. Sections were washed in PBS for three, 10-min intervals and permeabilized with 0.3% Tween-20/PBS. After 3 x 10-min washes with PBS, endogenous peroxidase was blocked by incubation sections in 3% hydrogen peroxidase/0.1% Tween-20/ PBS solution for 15 minutes, followed by 3 x 10-min washes with PBS. Section were then incubated for 2 h with a preblocking solution containing 10% FCS/ 1% BSA/ 0.3% Tween-20/PBS, pH 7.4. Sections were then incubated on an orbital shaker for 16-24 h at 4  $^{\circ}$ C with the primary EM-1 antiserum (C-14 A-APA) at the working dilution of 1:50, in a solution containing 10% FCS/ 1% BSA/ 0.3% Tween-20/PBS, pH 7.4. After 5 X 10-min washes with PBS, sections were incubated for 2 h in a 1:200 dilution of donkey anti-rabbit biotinylated (IgG) secondary antibody (Jackson Immunoresearch, USA) 0.05% Tween-20/10 mM PBS, pH 7.4. After 5 x 10-min washes in PBS, sections were incubated with the avidin-biotin complex (ABC Elite Vector kit; Vector, Burlingame, Ca) followed by 3 x 10- min washes. Color development was achieved by 5-10 minute incubation in a 0.04% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, SIGMA)/ 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/0.3% nickel sulfate/PBS, pH 7.4. Sections were then washed in PBS, mounted on slides, and air-dried overnight. Prepared slides were cleared

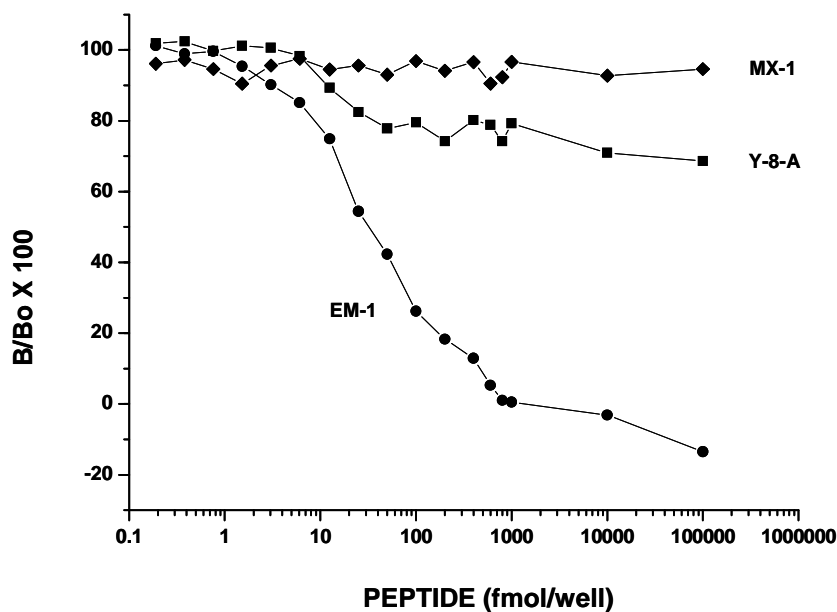
with xylene and coverslipped with 60% Permount/40% xylene mixture. For control of labeling specificity, adjacent sections were exposed to homologous and heterologous preabsorption with 0.1-10 $\mu$ M of EM-1 or 10-100  $\mu$ M of EM-2 (see figure 6) respectively, or with 0.1-100  $\mu$ M of structurally related opioid peptides (i.e.,  $\beta$ -endorphin, Met-enkephalin, Leu-enkephalin, Dynorphin A<sub>1-17</sub> and Tyr-W-MIF-1) (data not shown). Positive immunoreactivity of brain sections is referred as endomorphin-like immunoreactivity (EM-IR). The neuroanatomical areas displaying positive signals were identified according to the Atlas of the rat CNS of Watson and Paxinos (1999).

### 3.0 RESULTS

#### 3.1 Specificity of EM-1 and EM-2 antisera.

Specificity of antigen-affinity purified antisera for both EM-1 and EM-2 tetrapeptides were screened through immunoblot-dots assays and solid-phase-RIA using competitive neuropeptides (ME, LE, TW-MIF-1, SP) structurally related to endomorphin molecules (representative figures have been submitted to Brain Behavior & Immunology by Anton et al., 2007.). These results showed that the preferential antiserum for EM-1 (C-14 A-APA) cross-reacted to EM-2; whereas, the EM-2 antiserum (C-16 A-APA) cross-recognized EM-1 at different concentration of spotted peptides ( $2 \times 10^{-9}$  -  $2 \times 10^{-12}$  M) in blot-dot assays. In a similar extent, fmol sensitive SP-RIA raised for either EM-1 or for EM-2 (using  $^{125}$ I-endomorphin-1 or  $^{125}$ I-endomorphin-2, as labeled tracers in each assay) were capable of detecting measurable displacement of EM-1 or EM-2 of less than 50 fmol/well at the  $IC_{50}$  values. C-14 antiserum displayed a cross-reactivity <10% for EM-2 in the SP-RIA for EM-1 at the  $IC_{50}$  value; whereas, C-16 antiserum showed a cross-reactivity >90% for EM-1 in the SP-RIA for EM-2 at same measurable displacement value. Both RIAs showed no detectable cross-reactivity against competitive peptides such as, Dynorphin A<sub>1-17</sub>, Tyr-W-MIF-1, Substance P, Met-enkephalin, Leu-enkephalin, respectively (data not shown).

Based on the cross-reactivity of each purified antisera for EM-1-2 for endomorphin peptides, a fmol sensitive solid-phase-RIA for EM-1 (figure 1) was generated, in order to assess the cross-reactivity of the novel bioactive opioid octapeptide named as, Mexneurin-1 (MX-1) [a bioactive neuropeptide cloned from a whole mouse brain cDNA expression library (Stratagene) and shown to be encoded by a 1089 bp mRNA, which translates a polipeptide product named, as Mexneurin precursor (GENBANK, GI:34850572; 2004) (Antón et al., 2004; Leff et al., 2005)] and a synthetic decapeptide, Y-8-A (an H<sub>2</sub>N-terminus peptide construct in NCSPs that encodes the inverted motif of EM-2 —FFPY—) (see material and methods and figure 1). Solid-phase RIA, using the preferential antiserum for EM-1 (C-14 A-APA) and  $^{125}$ I-endomorphin-1, as the specific labeled tracer, showed to be highly sensitive and specific for EM-1 peptide, detecting EM-1 at a concentration range as low as  $32 \pm 4$  fmol/well at the  $IC_{50}$  value, with the smallest and largest measurable displacements of synthetic EM-1 of  $18 \pm 3$  fmol/well and  $80 \pm 10$  fmol/well at the  $IC_{80}$  and  $IC_{20}$  values, respectively. In general, no detectable cross-reactivity was detected for competitive peptides of Mx-1 and Y-8-A at the concentration range tested (0.1 fmol-100 pmol). However, the Y-8-A peptide was capable to displaced synthetic EM-1 at a low concentration of  $38 \pm 6$  fmol/well at the  $IC_{20}$  value, detecting no other detectable measurable displacement values within the assay (figure 1).



**Figure 1. Solid-Phase RIA for endomorphin-1 antiserum.** An affinity-purified antiserum for EM-1 (C-14 A-APA) were used to develop a sensitive and specific solid-phase radioimmunoassay for EM-1. The figure depicts a representative displacement curves for EM-1 in a solid-phase radioimmunoassay using the affinity-purified endomorphin-1 antiserum C-14. The mean and S.E.M IC20, IC50 and IC80 values for the assay were  $18 \pm 3$  fmol,  $32 \pm 4$  fmol and  $80 \pm 10$  fmol for EM-1. No significant cross-reactivity was detected against the bioactive opioid peptide Mexneurin-1 (Mx-1; TFSGYPAF) and the synthetic peptide fragment Y-8-A (YVKFFPYGDA) within the concentration range (0.1 fmol-100 pmol) of competitive peptides (see text for more details). The inter-assay coefficients of variation were 20% and the intra-assay coefficients of variation were 5%. Standards were conducted in quadruplet and the points represent the mean.

Based on the fmol sensitivity of the solid-phase-RIA for EM-1, showing a low-to-none cross-reactivity to EM-2 or structurally related peptides, respectively; this assay was further used to characterize the expression of EM1-immunoreactive material (EM1-IR) in chromatography eluted samples of purified protein and/or peptide fractions obtained from areas of the rat brain, as shown below.

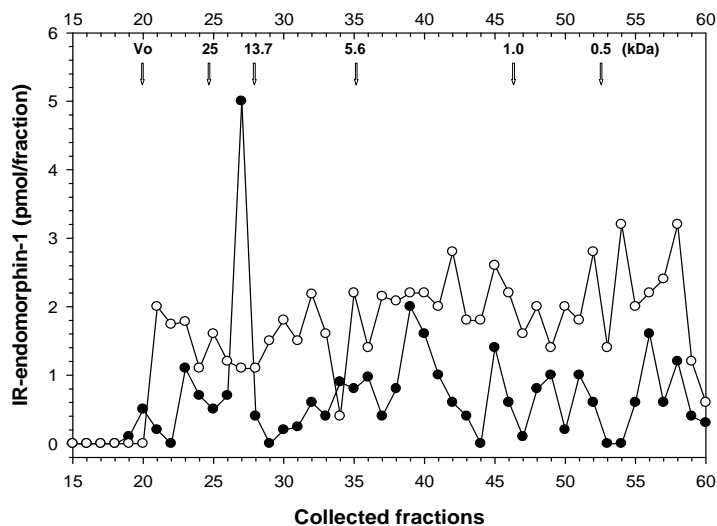
### 3.2 Chromatography analyses of rat striatum-riched peptide fraction .

Active opioid peptides are physiologically cleaved from large propeptide precursors through the hydrolyzing activity of tissue-specific endoproteases; which enhances their cell release as bioactive- low molecular weight peptides into the extracellular space (Burger, 1988). These endogenous proteases contain trypsin-like enzyme and Carboxipeptidase B activities involved in the cleavage of pair of basic residues flanking active peptide sequences which enhances the release of mature peptides from propeptide precursors after cleavage of monobasic residues at C-termini by carboxipeptidase activities (Hook and Loh, 1984). Thus, exposure of a rat brain-peptide fraction (expressing endomorphin motifs in high molecular weight peptide components) to trypsin/carboxipeptidase B treatment, should be able to generate endomorphin-like peptide material detected in chromatographic eluents with our specific RIAs for EM-1 or EM-2.

Thus, chromatography assays coupled to our solid phase RIA for EM-1 used to quantify EM1-2-IR in eluted samples from a riched peptide fraction rat striatum, treated or non-treated with trypsin/carboxipeptidase B, revealed a different chromatography profile of peptide-IR before and after enzyme digestion (figure 2). As depicted in the figure, the chromatography profile of eluted samples from the non-digested striatal peptide fraction, showed the detection of a predominant IR-peptide peak of ~15 kDa (5pmol/ fraction) that eluted close to the the elution position of 13.7 kDa protein marker (ribonuclease A) in addition, to the detection of less predominant IR-peaks (0.5-2.0 pmol/ fraction) shown to elute either within the range of elution position around the void volume marker ( $V_0$ ; Blue Dextran, 2000 kDa) and chymotrypsinogen A (25 kDa) and within the elution profile of low molecular weight markers (5.6-0.5 kDa) (figure 2). As shown, the elution profile of detected IR-peptide peaks from the enzyme-digested striatal peptide fraction, produced a widespread and homogenous detection of IR-peptide components, distributed along the elution position of calibrating markers smeared all over the chromatography profile.

Quite interesting to note, is that the concentration of detected IR-peptide peaks from non-enzymatic digested peptide fraction was found 1.5-2.0 times lower (0.4-2.1pmol/fraction) from those IR-peaks (1.8-3.2 pmol/fraction) of pre-digested striatal peptide fraction with trypsin/carboxipeptidase B.





**Figure 2. Sephadex G-50 chromatography of EM-1-2L-IR from a whole peptide extract of the rat striatum.**

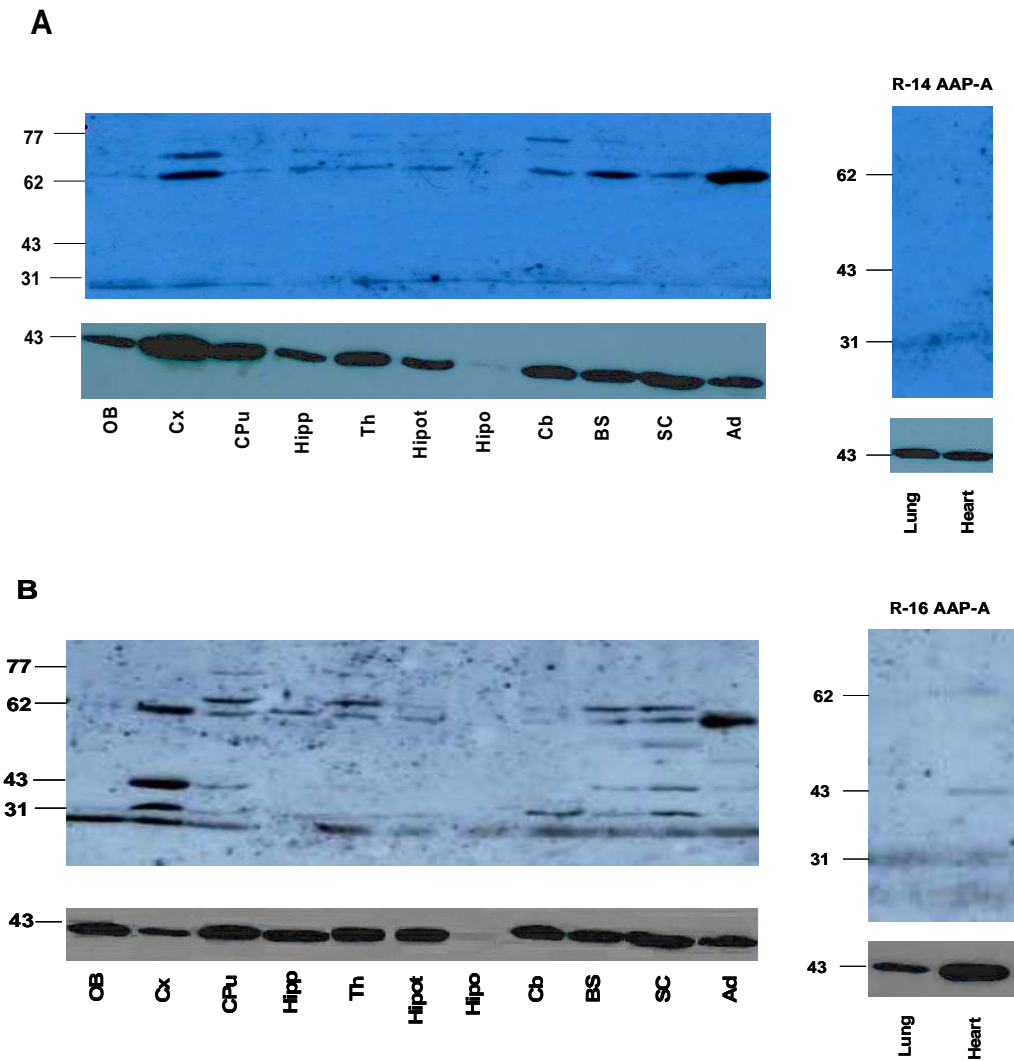
A whole peptide fraction obtained from rat striatum was centrifuged at 50,000 x g and the homogenate supernatant was applied to a 96 x 2 cm column and 4 ml fractions were collected. Aliquots of each fraction were lyophilized and resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.4.

EM-1-2L-IR was assayed by solid-phase RIA before (●) and after (○) enzymatic digestion with a mixture of trypsin and carboxipeptidase B (see text for details). The elution position of calibrating markers (arrows in the upper part of the plot) were as follows: Vo= Blue dextran 2000; Chymotrypsinogen A, 25 kDa; Ribonuclease A, 13.7 kDa; Insuline, 5.6 kDa; [Tyr63]-Synenkephalin 63-70, 1 kDa; Met-enkephalin, 0.5 kDa.

### 3.3 Western Blot analysis.

Western blot analysis of crude protein extracts from different neural regions of the rat brain showed that both affinity-purified antisera for EM-1 (C-14 A-APA) and EM-2 (C-16 A-APA) detected EM-IR in different molecular mass protein species, ranging from the lowest detected immunoreactive component of ~31 kDa to the highest detected protein component of ~77 kDa (figures 3A-B). Both antisera were capable of detecting an asymmetric expression of different immunoreactive protein species in most of the neural regions tested [Olfactory bulb (OB), Cortex (Cx), Caudoputamen (CPu), Thalamus (Th), Hippocampus (Hipp), Hypothalamus (Hipoth), Cerebellum (Cb), Brainstem (BS), Spinal cord (SC) and Adrenal gland (Ad) with the exception of the Hipophysis (Hipo) and non-neuronal tissues, such as heart and lung, used as controls of specificity EM1-2-IR in neural tissues, as revealed from the intensity of the immunochemical staining. Quite interesting to note is that although, both EM1-2 antisera converge in detecting two

major protein components of ~62 and ~70 kDa in most of the brain regions tested and adrenal (Ad); EM-1 antisera (C-14 A-APA) detected only the expression of these two-immunoreactive protein species (figure 3A); whereas the EM-2 antisera (C-16 A-APA) detected a differential expression of a large number of immunoreactive components, ranging from ~31 kDa- to ~77 kDa in same areas of the rat brain and adrenal gland (figure 3B). Moreover, based on the staining pattern detected with the C-14 A-APA; a high expression of the 62 kDa immunoreactive component was observed mainly in the Cx, BS, Cb, SC and Ad, showing the highest immunostaining in both Cx and Ad. Conversely, the expression of the ~70-kDa immunoreactive components with the EM-1 antiserum was only detected in the Cx and BS (figure 2A). Although, no detection of EM2-IR was observed in the Hypophysis (Hipo) and OB, a very low detection of protein components expressing peptide-IR could be observed in remaining areas of the rat brain (CPu, Th, Hipoth, Hipp). No detection of EM2-IR was observed in protein species in non-neuronal tissues of the heart or lung, used as controls to assess the specificity EM-IR in rat neural tissues. A more variable immunostaining of EM1-IR in protein species was observed with the C-16 A-APA. As shown in figure 3B, C-16 A-APA detected three-six immunoreactive protein species, ranging from the lowest molecular size of ~31 kDa to the highest molecular size detected of ~77 kDa, that appear to be differentially expressed in distinct areas for the rat brain, including the adrenal gland. Although the more conspicuous immunoreactive protein components identified were the same detected by the C-14 A-APA (~62 and ~70 kDa) in most of the brain areas tested (Cx, CPu, Hipp, Th, Hippot, BS, SC, Ad); two other well-defined immunoreactive protein components, ranging from ~31 to ~43 kDa, were detected with the specific EM-2 antisera (C-16 A-APA) showing an assymetric expression of EM-IR among the different brain areas tested; mainly in the Cx, BS, SC and Cb; detecting the highest immunoreactive staining in the Cx and SC, respectively (figure 3B). However, less visible immunoreactive protein species ranging from 45-60 kDa were also detected in the BS, SC and Ad, including the detection of high mass protein component in the striatum (CPu) of ~77 kDa. No detection of EM-1 immunoreactive protein components could be observed in the control non-neuronal tissue of the lung; whereas in the heart, a less visible immunoreactive band of ~43 kDa could be detected. Control experiments using the specific mAb-Actin (Segovia et al, 1996) showed positive immunoreactivity to the actin- $\alpha$ -subunit protein (43 kDa) in all areas of the rat brain tested for EM-IR, including the adrenal and non neuronal control tissues, as depicted in the corresponding panels shown below each blotting experiment of both EM1-IR and EM-2-LI, in figures 3A-B, respectively.

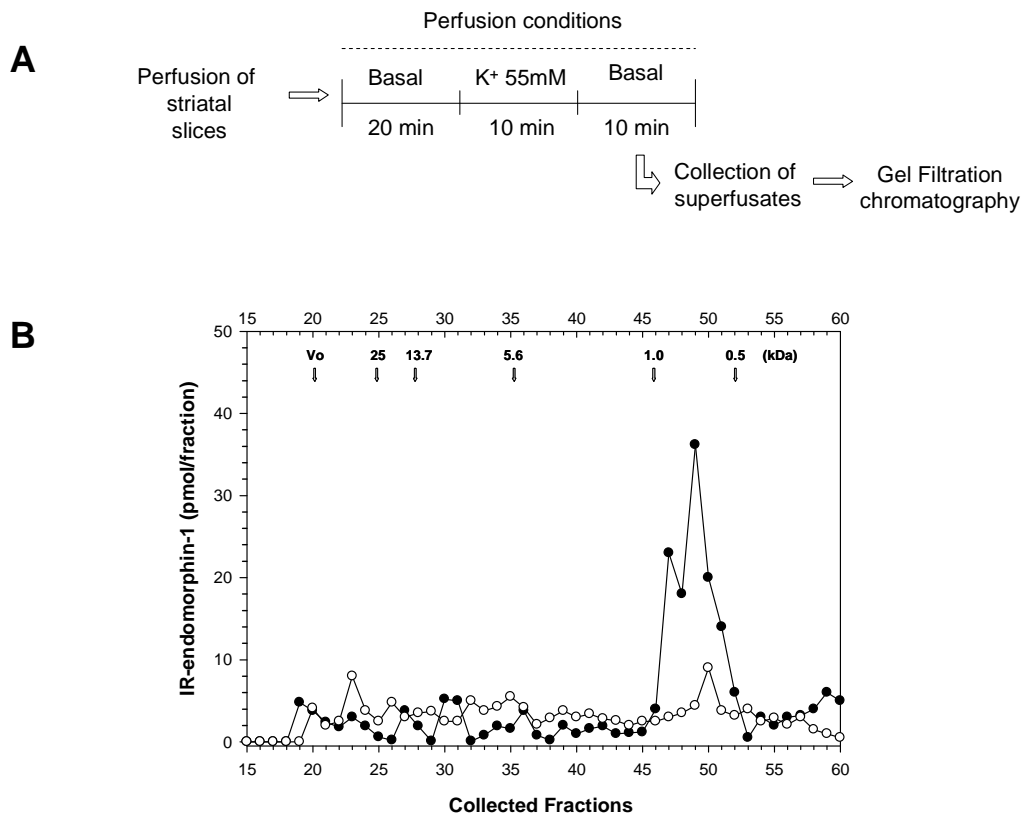


**Figure 3. Representative Western blots for screening endomorphin-1-2-like immunoreactive protein material from neural areas of the rat brain.** Protein extracts from the different neural areas of the rat brain were detected with R-14 A-APA (**A**) and R-16 A-APA (**B**). The brain areas screened for endomorphin-like immunoreactivity contained in high molecular mass protein material as shown at the bottom of each lane. Molecular markers are indicated at the column at the far left, 31, 43, 62, 70, 77 kDa. (**A**) shows the immunoreactivity for EM-1 expressed in several high molecular mass protein components as detected with R-14 A-APA (dilution 1:40). (**B**) shows the immunoreactivity for EM-2 expressed in two main high molecular mass protein components detected with R-14 A-APA (dilution 1:20). Note the variable expression

of different protein species containing EM-1-2L-IR using both antiendomorphin antisera. Both antisera converged in detecting EM-1-2L-IR in two main protein species in the neural arteas tested of  $\square$  62 kDa and 70 kDa. Abbreviations: Cx, cortex; Cpu, caudoputamen; Hipp, hippocampus; TH, thalamus; Hypot; Hypothalamus; BS, brainstem; Cb, cerebellum; SC, spinal cord, Adrenal gland (Ad). **(Right panels)** Controls of non-neuronal tissues (Lung and Heart) for each antiserum.

### 3.4 Chromatography analyses of superfusate fractions

Figure 4 depicts the elution profile of IR-peptide material released from rat striatum with 55 mM KCl/1.8 mM CaCl<sub>2</sub>. As shown, gel permeation chromatography coupled to our SP-RIA for EM-1 detected two predominant IR-peptide peaks of low molecular weight of  $\sim$ 1.0 kDa (23 pmol/fraction) and  $\sim$ 0.7 kDa (36 pmol/fraction) respectively. However, less conspicuous IR-peaks ( $\leq$  5 pmol/fraction) were observed along the elution of high and low molecular weight markers (25-5.6 kDa). Exposure of collected superfusates from depolarized tissue to trypsin/carboxipeptidase B digestion, produced a significant change in the elution profile of IR-peptide peaks, detecting a single and smaller IR-peak of  $\leq$ 10 pmol/ fraction of  $\sim$ 0.6 kDa.

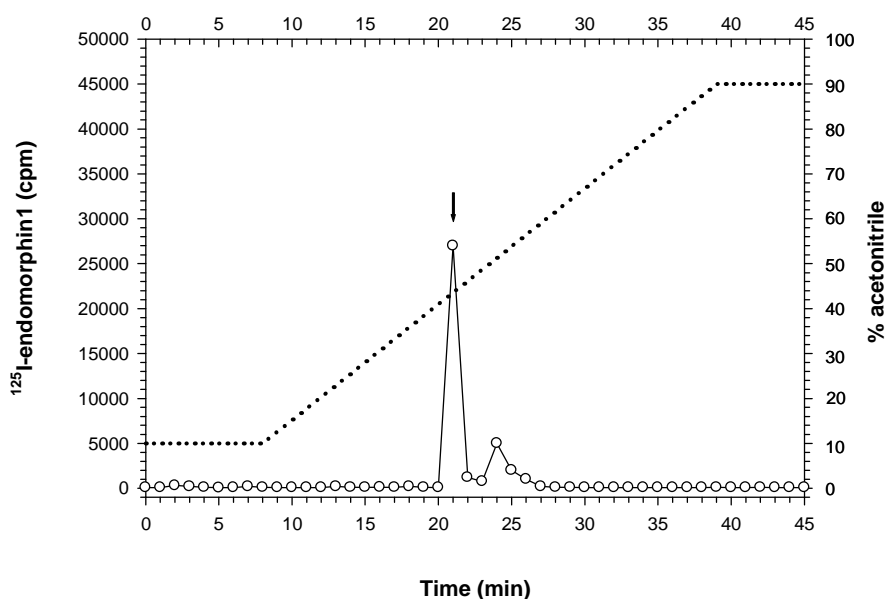


**Figure 4. Sephadex G-50 chromatography of superfusates from depolarized rat striatum.** (A) Illustrates the perfusion conditions and collection of stimulated superfusate fractions from freshly-prepared rat striatum slices. Superfusates collected from evokely released rat striatum slices after 10 min exposure with 55 mM KCl were exposed to gel filtration chromatography and HPLC analysis. (B) Illustrates the gel filtration chromatography analysis of EM-LI evokely released from depolarized rat striatum slices. Gel permeation chromatography was conducted by applying aliquots of superfusate fractions to a 96 x 2 cm column and collecting 4 ml fractions from the eluting gel. After chromatography, aliquots of each fraction were lyophilized and resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.4. Detection and quantification of released EM-1-2L-IR was carried out by our solid-phase RIA. EM-LI was assayed before (●) and after (○) enzymatic digestion with trypsin and carboxipeptidase B (see text for details). The elution position of calibrating markers (see arrows in the upper part of the plot) were as follows:  $V_0$ = Blue dextran 2000; Chymotrypsinogen A, 25 kDa; Ribonuclease A, 13.7 kDa; Insuline, 5.6 kDa; [Tyr63]-Synenkephalin 63-70, 1 kDa; Met-enkephalin, 0.5 kDa.

---

### 3.5 HPLC analyses of evokely-released EM-IR into striatal superfusates

Reverse-phase HPLC was carried out to confirm the identity of EM1-2-like immunoreactive material released into collected superfusates from depolarized rat striatum slices (Figure 5). HPLC analysis showed that collected superfusates eluting as IR-peptide immunoreactive of low molecular mass from gel permeation chromatography, co-eluted as a single IR-peak component with synthetic endomorphin (EM-1). This single IR-peptide peak showed a retention time of  $\cong$  20 min in three separate experiments, and accounted for >90 % of the total immunoreactive material injected onto the column as estimated from the aliquots assayed with the specific RIA for EM-1.

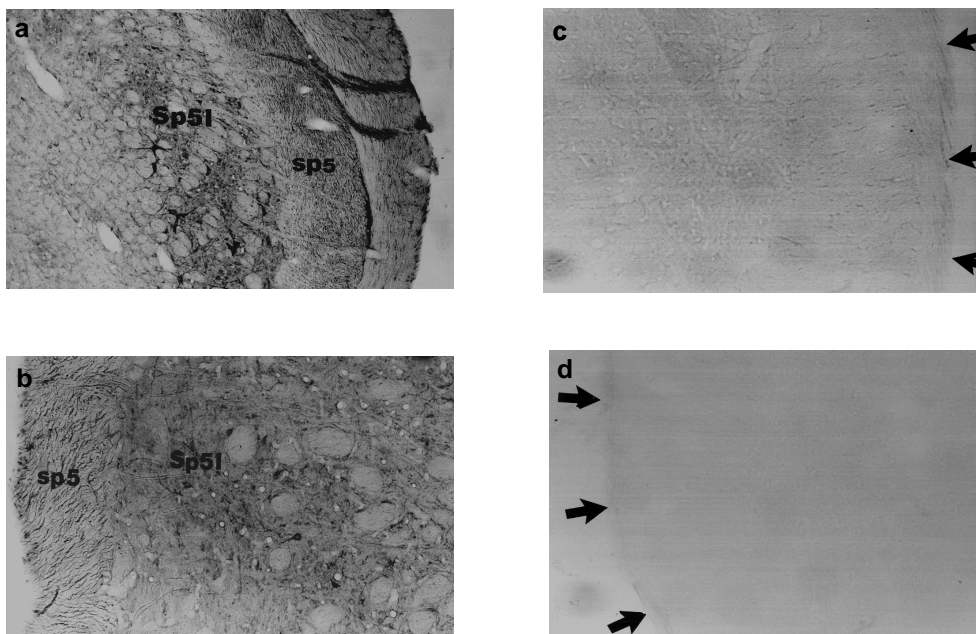


**Figure 5. RP-HPLC of EM-1-LI recovered from superfusates of depolarized rat striatum.**

Aliquots fractions 45-53 from the Sephadex G-50 eluates (see Fig. 4) were pooled, dried, resuspended in 0.1% TFA and applied to a reverse-phase HPLC column. Elution was performed using an acetonitrile gradient of 10% over 10 min and 10-90% over the rest 35 min (dashed line). The flow rate was 1 ml/min and 1 ml fraction were collected, resuspended in RIA buffer and assayed for EM-1-LI (○). The elution position of synthetic endomorphin-1 is represented by the arrow.

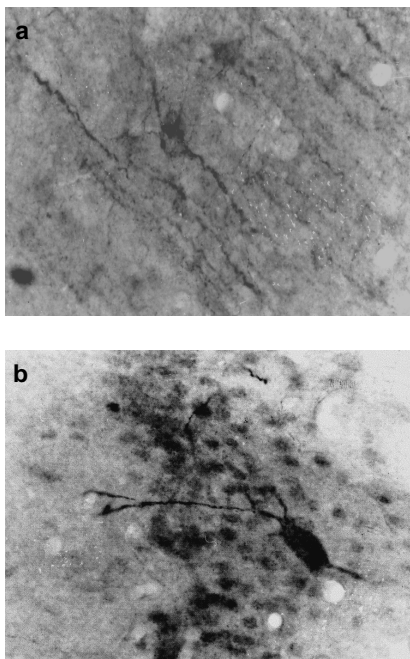
### 3. 6 Immunohistochemistry for endomorphins

Preabsorption of preferential EM-1 antiserum (C-14 A-APA) with 10 $\mu$ M of EM-1 or 100  $\mu$ M of EM-2, showed a complete attenuation on the labeling pattern of EM-IR in rostral sections of the rat medulla, used as tissue controls of antiserum specificity (figure 6, panels C-D). Conversely, an intense labeling of EM1-IR was observed in the trigeminal nerve (Sp5I) nucleus and spinal tract (sp5) (figure 6, panels A-B) using the preferential EM-1 antiserum diluted 1:50 (see material and methods). Similar staining intensity of EM1-IR was observed when EM-1 antiserum was preabsorbed with different serial concentrations (0.1, 1.0, 10, 100  $\mu$ M) of distinct competitive opioid peptides, such as  $\beta$ -endorphin, Met-enkephalin, Leu- enkephalin, Dynorphin A<sub>1-17</sub> and Tyr-W-MIF-1, respectively (data not shown).



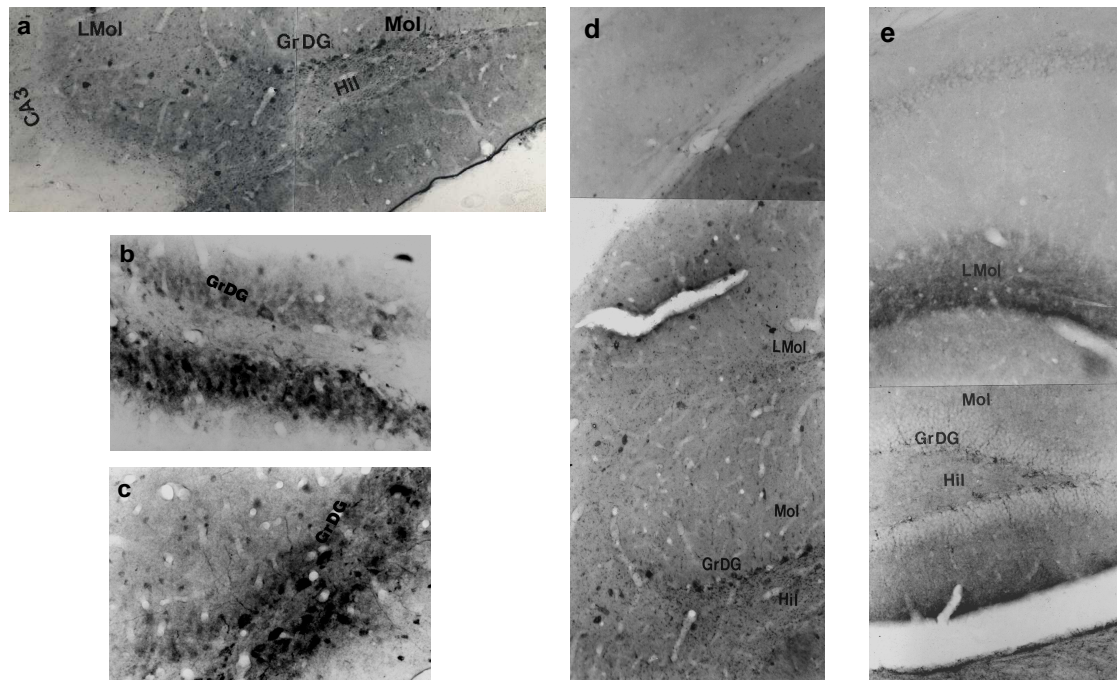
**Figure 6. Photomicrographs of absorption controls of EM1-2-LI.** (A, 100x) and (B, 45x) depict representative control rostral sections of rat medulla stained for endomorphins using R-14 A-APA at a dilution 1:50. Note the prominent labeling in both the nucleus of spinal tract of trigeminal nerve (Sp5I) and spinal tract (sp5) of trigeminal nerve. The staining was abolished in adjacent sections by preadsorption of R-14-A-APA with 10  $\mu$ M of EM-1 (C, 100x) and 100  $\mu$ M of EM-2 (D, 45x) (arrows). No significant reduction of labeling was observed after controls of adjacent sections were preabsorbed with 0.1-100  $\mu$ M of Beta-endorphin, Met-enkephalin, Leu-enkephalin, Dynorphin A1-17 and Tyr-W-MIF-1 (data not shown) (see text and methods, section 2.12 for details). Scale bars = 200  $\mu$ m.

Moderate to high immunopositive staining of EM1-IR was observed widely-distributed along the rostro-caudal aspects of areas of the rat brain, using the EM-1 antiserum diluted 1:50, as depicted in figures 7-12. In the most rostral aspects of the rat brain, at the level of the telencephalon, EM-IR was sparsely distributed throughout all cortical fields (i.e., cingulate cortex, paleo and neocortex) and moderately expressed in oval-round shaped cells distributed in layers II-III or in pyramidal-shaped-like perikarya and branch-fibers protruding from somata in cortical layers IV-V (see figure 7, panels A-B). At the level of the hippocampus, staining was observed in round to oval-shaped somata dispersed in reactive neuropil distributed along the different hippocampal layers, dentate gyrus and hilus dentate area (figure 8, panels A-E).



**Figure 7. Photomicrographs of EM-LI in the cingulate cortex of the rat brain.** EM-LI was moderately expressed throughout all cortical fields. As shown in the figure, EM-LI was predominantly observed in cortical cells distributed in layers IV-V. Note the pyramidal-like perikarya and fiber branches protruding from somata (**A**, 250x) and oval-round shaped cells distributed through layers II-III (**B**, 250x). Scale bars = 200  $\mu$ m.

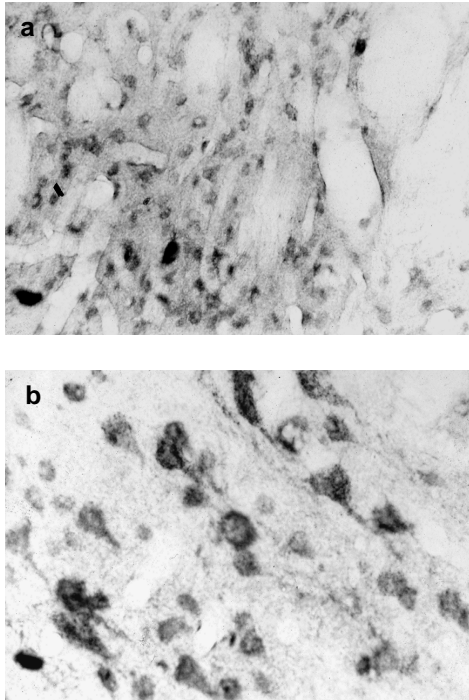




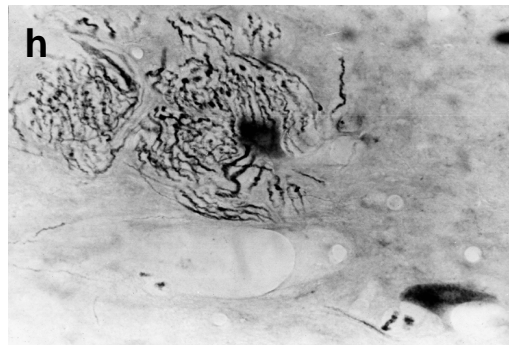
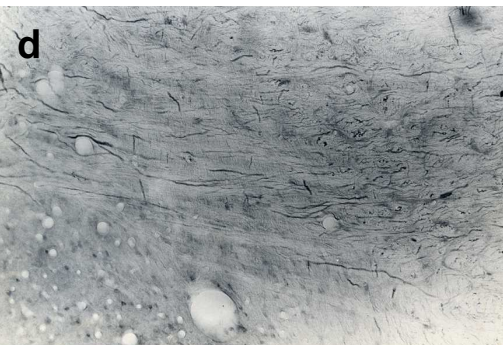
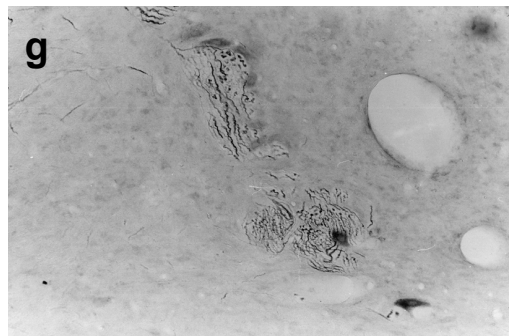
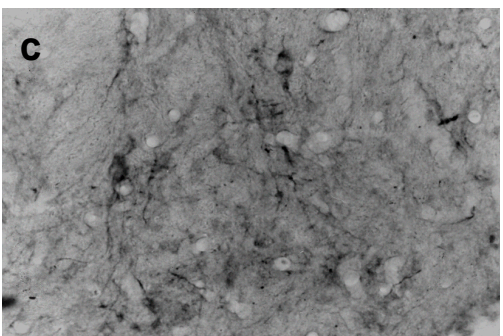
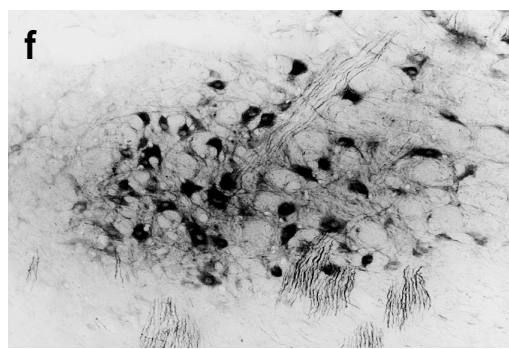
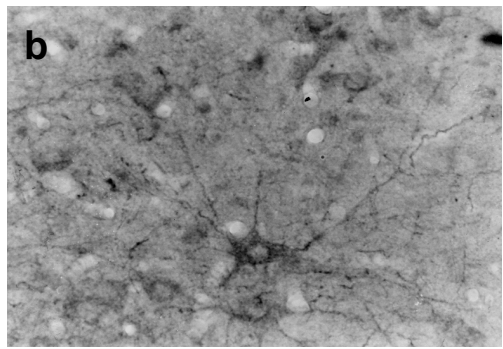
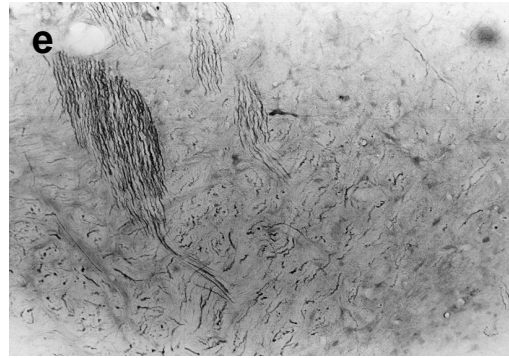
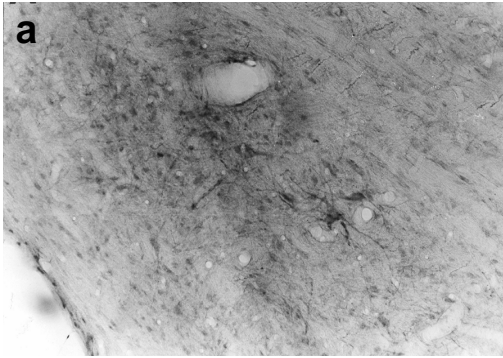
**Figure 8. Photomicrographs of EM-LI in the rat hippocampus.** Moderate to high labeling was observed in round to oval-shaped somata dispersed in a reactive neuropil distributed throughout the layers of the hippocampal formation, including the dentate gyrus and hilus dentate area. Figure in **A** (100x) shows a representative immunostaining through CA3-dentate gyrus area. Photos in **B** and **C** (250x) show a magnification of the granular layer of the rat dentate gyrus (GrDG) stained with R-14 A-APA. Note the moderate and high staining of oval-round shaped cells in this area. Photos in **D** and **E** (100x) shows EM-LI distributed throughout the lateral (**D**) and medial aspects of the hippocampal formation. Abbreviations: LMol, molecular layer; Mol, GrDG; dentate gyrus-granular layer; Hil, Hilus dentate area; CA3, CA3 hippocampal field. Scale bars = 200  $\mu$ m.

At the level of the caudo-putamen highly stained oval-round shaped somata-like striatal cells was observed against a sparse labeled neuropil dispersed throughout the rostro-caudal region of the striatum (figure 9, panels A-B). At the level of the mesencephalus (figure 10) representative pattern of the EM-IR staining was detected in scattered perikarya and neuropil localized in different nuclei, such as the substantia nigra: pars compacta and pars reticulata (figure 10, panels A-C); ventral tegmental area (VTA), medial lemniscus and red nucleus (figure 10, panels E-F); the nucleus of the mesencephalic tract of the trigeminal nerve; superior colliculus; deep

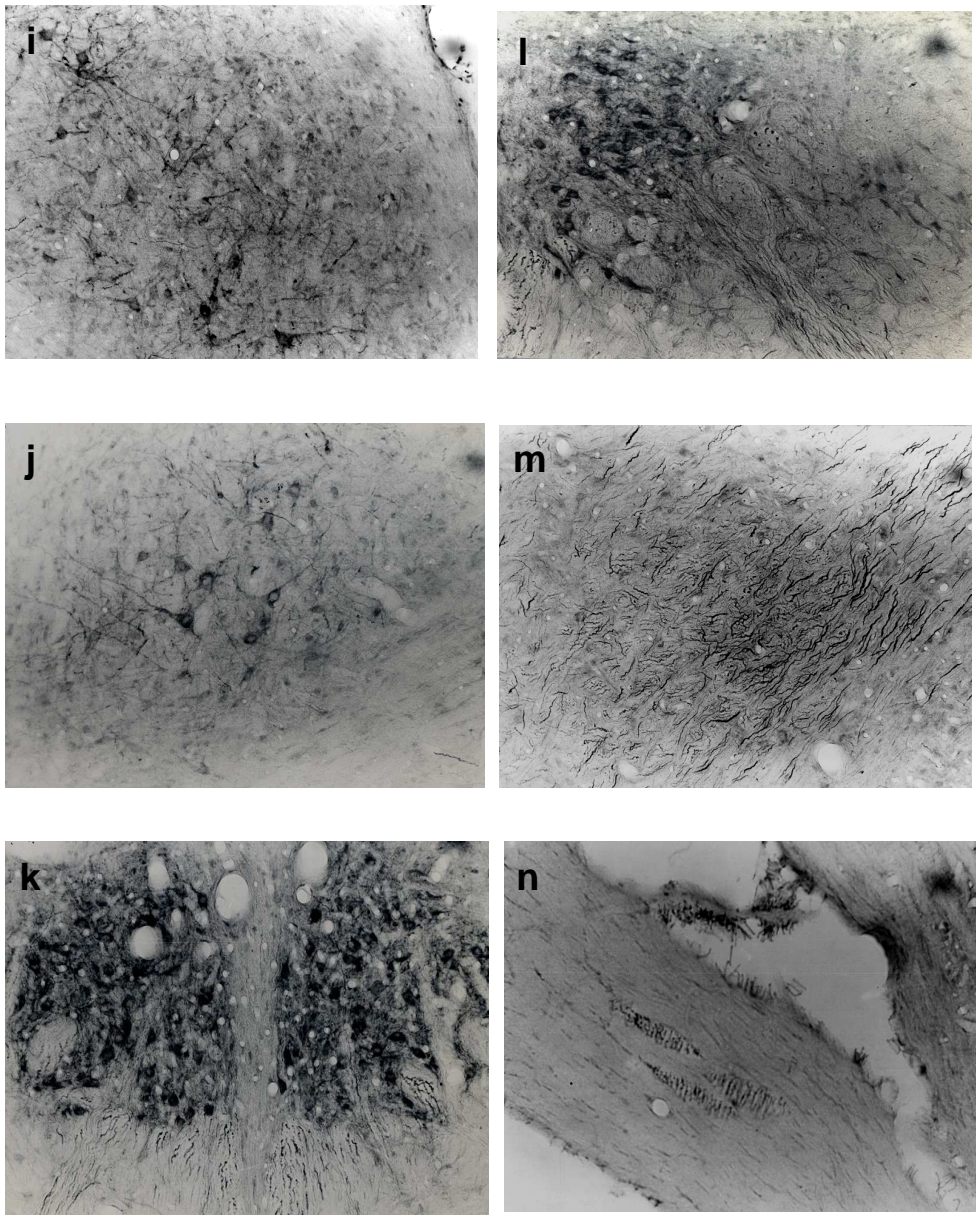
mesencephalic nucleus; principal oculomotor nucleus; nucleus of Darkschewitsch (figure 10, panels G-L); including some aspects of the sensory and motor roots of the trigeminal nerve at the caudal and rostral level of the mesencephalon and pons (figure 10, panels M-N). Moreover, EM1-like immunoreactive material was detected in rostrocaudal areas of the brainstem (figure 11). As shown in the figure EM1-IR was observed in scattered oval-to-round-shaped somata, distributed in sparsely neuropil, as shown in the medial lemniscus fasciculus (figure 11, panel A) the parvocellular reticular nucleus (figure 11, panel B) the gracile and the cuneatus nuclei (figures 11, panels C-D).



**Figure 9. Photomicrographs of EM-LI in the caudo-putamen of the rat.** EM-LI was observed throughout the rostro-caudal regions of the striatum. Representative patterns of this immunostaining within this brain area are depicted in **A** (250x) and **B** (1000x) which show the oval-round shaped perikarya of striatal cells stained against a sparse labeled neuropil dispersed throughout the caudo-putamen of the rat. Scale bars = 200  $\mu\text{m}$ .



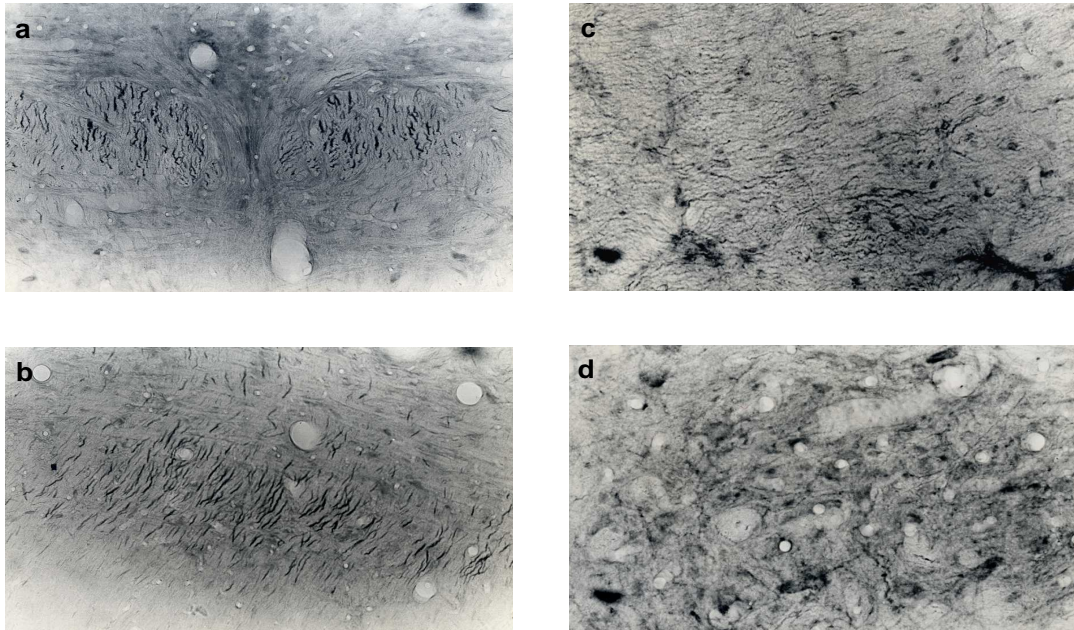




**Figure 10. Photomicrographs of EM-LI in rostro-caudal structures of mesencephalon and brainstem of the rat.** EM-LI was observed in multiple areas and nuclei localized within the brainstem and mesencephalon of the rat. Representative pattern of detected immunostaining (panels A-N) showed that most of the labeling was localized in scattered perikarya and neuropil. Representative labeled structures in these brain areas are the substantia nigra (A, 100x), pars compacta (B, 250x), pars reticulata (C, 250x), ventral tegmental area, VTA (D, 100x), medial lemniscus (E, 100x) red nucleus (F, 100x), nucleus of the mesencephalic tract of the trigeminal

nerve (**G**, 100x; **H**, 250x), superior colliculus (**I**, 100x), deep mesencephalic nucleus (**J**, 100x) principal oculomotor nucleus (**K**, 100x) nucleus of Darkschewitsch (**L**, 100x), including the sensory (**M**, 100x) and motor (**N**, 100x) roots of the trigeminal nerve. Scale bars = 200  $\mu$ m.

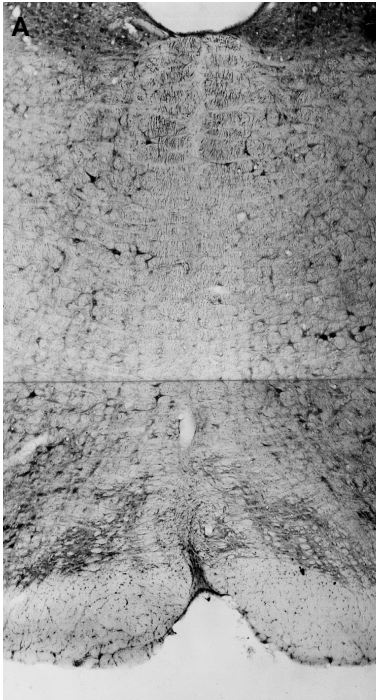
---



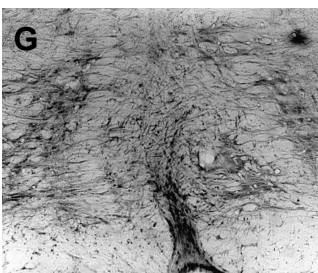
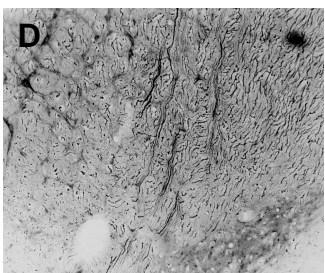
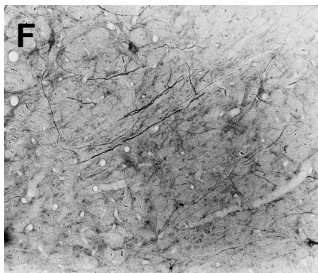
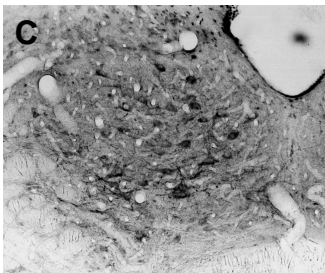
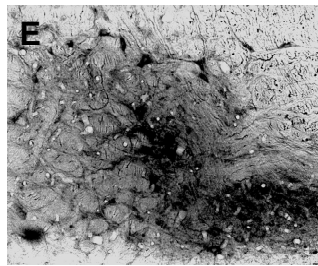
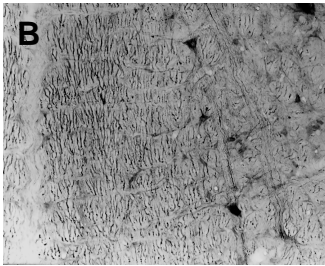
**Figure 11. Photomicrographs of EM-LI in brainstem areas.** A pattern of high labeling for endomorphin immunoreactive material was observed predominantly in scattered areas of the brainstem, such as the medial lemniscus fasciculus (**A**, 100x), parvocellular reticular nucleus (**B**, 100x) including the gracile and (**C**, 250x) and the cuneatus (**D**, 250x) nuclei. Scale bars = 200  $\mu$ m.

---

At the level of the medulla (figure 12, panels A-G) and cervical spinal cord (figure 12, panels H-I) representative labeled structures showed that EM1-IR was localized in perikarya, neuropil, dense plexus and varicose fibers, respectively. Examples of such structures are the paramedian reticular nucleus (figure 12, panel B); hypoglossal nucleus and nerve (figure 12, panels C-D); the motor nucleus of the vagus, the nucleus of the solitary tract, the inferior olive and raphe pallidus nucleus, respectively (figure 12, panels E-G). At the most rostral portion of the cervical spinal cord, the spinal tract-trigeminal nerve (Sp5I) and associated fiber tracts (sp5) showed a predominant high immunoreactive staining of EM1-IR (figure 12, panel H). At the nucleus of trigeminal nerve (Sp5I) most staining of EM-IR was localized in somata in dispersed dense reactive neuropil, associated with a dense immunoreactivity of abundant thick axon-like fibers in the tract of the spinal trigeminal nerve (figure 12, panel I).



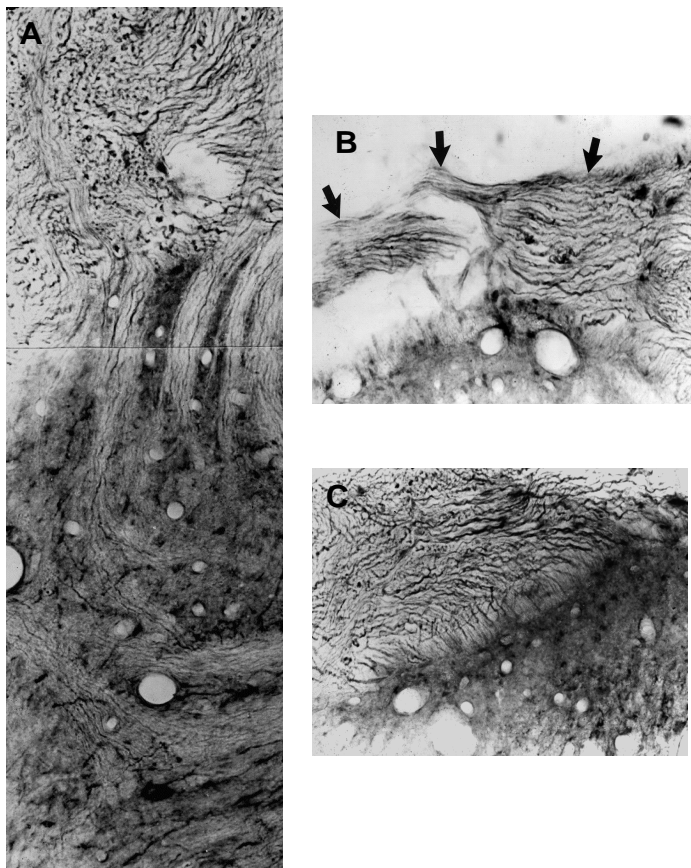
**Figure 12. Photomicrographs of EM-LI in medulla and upper spinal cord.** A representative pattern of labeled rostro-caudal structures (panels **A-G**) within the medulla (**A**, 45x) and cervical spinal cord (**H**, 45x; **I**, 100x) showed that most of the immunostaining was localized in perikarya and neuropil. Representative examples of labeled structures shown are paramedian reticular nucleus (**B**, 100x), the hypoglossal nucleus (**C**, 100x) and nerve (**D**, 100x), the motor nucleus of the vagus (**E**, 100x), the nucleus of the solitary tract (**F**, 100x) including the inferior olive and raphe pallidus nucleus (**G**, 100x) as well as the nucleus of the spinal tract of the trigeminal nerve (Sp5I) and associated fiber tracts (sp5) (**H**, 45x).



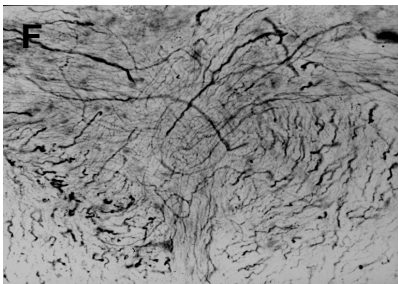
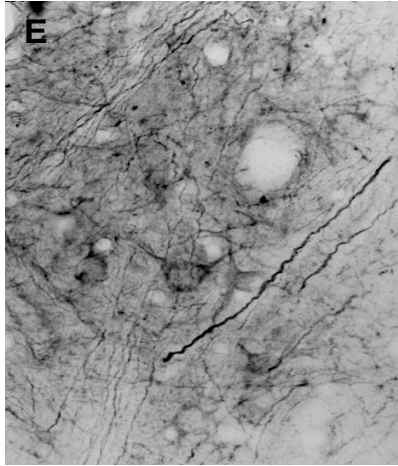
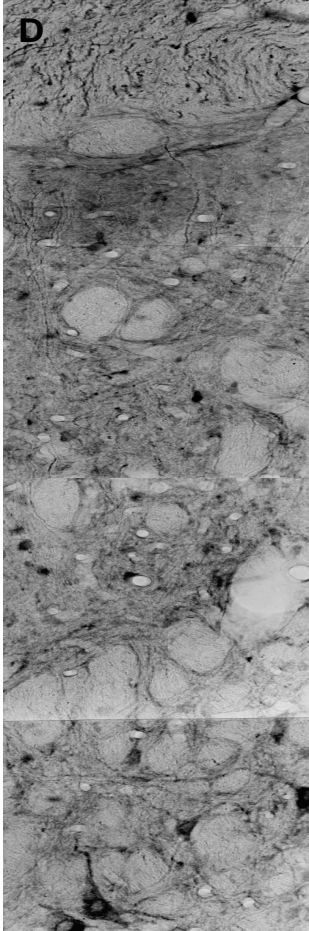
Higher magnification of trigeminal nerve (Sp5I) and fiber tracts (sp5) depicted in **H** is shown in **I** (100x). Note the very high EM-LI localized in somata dispersed in a dense reactive neuropil within sp5I and the dense immunoreactivity in abundant thick axon-like fibers in tract of the spinal trigeminal nerve. Scale bars = 200  $\mu$ m.



Finally, at the level of caudal portion of the cervical cord and rostral portion of the thoracic cord most of detected EM-IR displayed almost similar labeling pattern throughout various segments of the spinal cord (figure 13, panels A-D). Positive staining in the dorsal horn (figure 13, panel A) demonstrated that most EM-IR was localized within the sensory dorsal root as well as sensory fibers penetrating the white matter (figure 13, panels B-C). Most of the detected immunostaining at the superficial layers of the dorsal horn displayed immunoreactive thick-fiber bundles that arise from the Lissauer tract which penetrate the most superficial layers I-III of the dorsal horn (figure 13, panel D). The Labeling pattern of EM-IR at the level of the ventral horn displayed an almost a similar immunoreactive staining found in the dorsal horn, observing scattered labeled somata and labeled thick crossing-fibers penetrating layers V-IX (figure 13, panel E) as well as fibers crossing layer X and central canal (figure 13, panel F) respectively.



**Figure 13** - **Photomicrographs of EM-1-2L-IR in spinal cord.** The pattern of EM-1-2L-IR showed to be almost similar throughout the distinct segments of the spinal cord (A-F). As shown in figure (A, 100x) the pattern of labeling in the dorsal horn was observed in somata dispersed in a dense immunopositive neuropil through layers I-IV. Very high EM-1-2L-IR was observed in thick-axon like fibers within the sensory dorsal root (arrows) (B, 250x) as well as in fibers penetrating the white matter of the dorsal horn (C, 250x).



In most superficial aspects of the dorsal horn the immunostaining was detected in labeled fiber bundles penetrating through layers I-III, arising from the tract of Lissauer (**D**, 250x). Scattered labeled somata and thick crossing-fibers were labeled through layers V-IX of the ventral horn (**E**, 250x) as well as through layer X around the central canal (**F**, 250x). Scale bars = 200  $\mu\text{m}$ .



#### 4.0 DISCUSSION

Recombinant DNA technology and cloning procedures (Glick and Pasternak, 1998; Kaufman and Tobin, 1984) have been routinely used to clone and characterize distinct mRNAs from neural tissues that encode large propeptide precursor proteins which contain active sequences of opioid and non-opioid peptide transmitters (Dores et al., 2002; Reinscheid et al., 2000). These identified mRNAs include the four major family of opioid propeptide precursor proteins namely, the proopiomelanocortin (Li & Chung, 1976); proenkephalin A (Noda et al., 1982; Gubler et al., 1982; Comb et al., 1982) prodynorphin (Horikawa et al., 1983) and the latest identified, the pronociceptin/OFQ peptide system (Saito et al., 1995; Nothacker et al., 1996) which produced during postranslation processing the release of biologically active opioid neuropeptides, namely,  $\beta$ -endorphin, Methionine and Leucine-enkephalins, Dynorphin A and B; and nociceptin/OFQ peptide, respectively (Brownstein, 1993; Reinscheid et al., 1995; Meunier et al., 1995). However, based on such molecular procedures, no data has been reported yet on the molecular identification and characterization of large precursor(s) protein(s) coding for the novel opioid peptides, EM-1 and EM-2 (Zadina et al., 1997); despite of the extensive reports showing the diversity of functional bioactivities and the immunohistochemical localization of EM1-IR and EM-2 LI in the rat brain (Zadina et al., 1999). Thus, one way to circumvent the molecular strategies, which have failed in the identification and cloning of a potential propeptide precursor(s) protein(s) for endomorphins, is to employ antibody-based screening approaches (i.e., solid-phase RIA) coupled to standard chromatography procedures, so as to initially characterize endomorphin-like peptide sequences in high and low molecular mass protein(s) or peptide(s) species from protein or peptide fractions of the rat brain,.

In such context, two antigen-affinity-purified rabbit antisera (C14/C-16 A-APA) were generated against the synthetic EM-1 and EM-2 peptides and validated in blot-dots and in a fmol-sensitive solid-phase RIAs for potential cross-reactivity against both endomorphin molecules and structurally related opioid and non-opioid peptides, as well (Anton et al., 2007; paper submitted to Brain, Behavior and Immunity) . Such results demonstrated that both C-14 and C-16 antisera cross-recognized EM1-2 tetrapeptides, with different avidities (i.e, C-14 A-PAA exhibited a low cross-reactivity for EM-2 of <10% in the SP-RIA for EM-1, whereas C-16 A-PAA showed a much greater cross-reactivity to EM-1 of >90% in the SP-RIA for EM-2) but not other structurally related bioactive peptides (LE, ME, SP, Tyr-W-MIF-1; Dynorphin A<sub>1-17</sub>). In addition to the previous immunoassays, SP-RIA for EM-1 showed that C-14 antiserum was unable to cross-react to heterologous synthetic peptides, such as the novel bioactive opioid peptide—Mexneurin-1 (Mx-1) [which encodes a non-amidated EM1-2-like peptide sequence motif at the C-

termini domain of Mx-1 (Antón et al., 2004)] or the peptide construct, Y-8-A, that encodes the inverted peptide sequence motif of EM-2 —FFPY—, at the H<sub>2</sub>N-termini domain in the Visinin-like protein-1 (Vsnl-1) (Antón et al., 2002) (figure 1) and in most neuronal calcium sensor proteins in mammals (Spilker et al., 2002; Braunewell and Gundelfinger, 1999). Furthermore, blot-dot assays and SP-RIA for EM-2 using the C-16 antiserum, showed no detectable cross-recognition to the FF motif encoded by SP peptide (Anton et al., 2007) and by the peptide fragment —Y-8-A— (figure 1). Therefore, these results prove thus far, the high selectivity and specificity of each EM1-2 antisera to detect and/or cross-react against their cognate tetrapeptides.

Validation of the specificity of each endomorphin antisera in both blot-dots and sensitive solid-phase RIA for EM-1-2 tetrapeptides, led us to search for EM1-2-peptide sequences encoded in protein or peptide preparations obtained from neural and extraneural tissues of the rat and tested either in western blot assays, using both C-14 and C-16 antisera (figure 3) or gel permeation chromatography studies coupled to our SP-RIA for EM-1 (figure 2 and 4).

Western blots assays, using either C-14 or C-16 antiserum and performed under extreme denaturalization conditions, revealed an assymmetric detection of peptide-immunoreactivity expressed in high molecular mass-protein components, ranging from  $\cong$  77 to 31 kDa in mostly all areas of the rat brain and adrenal gland tested, with the exception of the hipophysis (figure 4A-B). However, despite of the assymmetric immunoreactive-staining of protein material among the rat tissues tested, both C-14/C-16 antisera converge in the detection of two highly-stained immunoreactive protein species of 70 and 62 kDa. These results showed that EM-2 antiserum covered a broader spectrum of peptide-immunoreactivity in high-to-low protein components, ranging from 77-31 kDa, when compared to those detected (70 and 62 kDa) by EM-1 antiserum. This disparity on the assymmetric detection of eEM-IR material in distinct protein components, using each C-14 or C-16 antiserum, could be explained on factors determining antibody-antigen interactions, such as antibody specificity and antibody avidity (Harlow and Lane, 1999). In this context, C-14 polyclonal antiserum proved to react with higher selectivity and specificity against EM-1 peptide versus EM-2 in the solid-phase RIA for EM-1; whereas, C-16 antiserum displayed close-related specificities when reacting against both EM peptides in the solid-phase RIA for EM-2 (Anton et al., 2007). Thus, C-16 polyclonal antibodies may exhibit a much greater versatility but reduce specificity, when detecting EM1-2 epitopes in high mass protein protein material; opposite to C-14/antibodies, which appear to display a narrower selectivity but higher specificity, when detecting much better EM-1 epitopes expressed among a wide-range of protein components.

Gel permeation chromatography analyses of a riched rat striatum peptide fraction showed the elution profile of a predominant EM-IR peptide peak (~5pmol/ fraction) of ~15 kDa as well as

other less predominant immunoreactive peaks ( $\leq 2.0$  pmol/ fraction) of low molecular mass components ( $\sim 5.6$ - $0.5$  kDa) (figure 2). Exposure of the riched-striatal peptide fraction to trypsin/carboxipeptidase B treatment produced a widespread and homogenous detection of EM-immunoreactivity distributed all over the chromatographic profile. These results suggest that enzyme activity induced a non-specific hydrolysis of EM-like peptide sequences encoded in both high and low molecular mass-protein components that eluted from the column, along the elution position of calibrating markers. Such hydrolysis of EM1-2 epitopes enhanced the chromatographic-smearing of detected immunoreactive peaks prior to the exposure to enzyme treatment. Moreover, the increased concentration of peptide immunoreactivity detected in the eluent samples after enzyme treatment, may have resulted from an enhanced exposure of cryptic EM1-2 epitopes, not detected before, under induced-denaturing conditions in these studies by the C-14 antiserum.

Studies performed to analyze the enzymatic degradation of endomorphins upon exposure of combined proteolytic enzymes (i.e., carboxipeptidase Y and A, proteinase A and aminopeptidase M) showed a chromatographic pattern of identified endomorphin metabolites, after enzyme treatment (Peter et al., 1999). For instance, these studies showed that carboxipeptidase Y and proteinase A hydrolyze the C-terminal amide group, splitting the tetrapeptides at Trp (3)-Phe (4) and Phe (3)-Phe (4) bonds in both EM-1 and EM-2 peptides, respectively, leaving degraded peptide fragments to aminopeptidase proteolytic activity. Thus, in a similar fashion, cleavage of peptide bonds of our striatal preparation by trypsin/carboxipeptidase B, enhanced the detection of complete hydrolyzed immunoreactive material that eluted from the column as homogenous, non-resolved immunoreactive-peptide peaks.

The presence of the endomorphin-peptide motifs of four amino acids in other functional proteins found in neurons and/or in non-neuronal cells in mammals may not be surprising. Molecular and cloning procedures employed to transfect bacteria with a whole mouse brain cDNA expression library (Stratagene) coupled to antibody-based screening methodologies used in our lab; led to the identification of two different mRNAs, which encode for two novel and functional neuronal proteins in the CNS of mammals. One of this mRNAs cloned from the mouse brain codes for a 91 aa polypeptide precursor, named as Mexneurin (Anton et al., 2004; Genbank AY142705) which encodes an H<sub>2</sub>N-terminal opioid octapeptide —Mexneurin-1 (Mx-1) — and a another 31 aa — C-terminal polypeptide with non-opioid activity (see material and methods for further information) (Anton et al., 2004; Leff et al., 2005). Next mRNA cloned, showed to code for a 191 aa — Visinin-like protein-1 (22 kDa) (Mus musculus Vsn-1 mRNA) (Anton et al., 2002; GenBank AY101375) which encodes the peptide motif of EM-2 —YPFF— with an inverted orientation —FFPY— aligned at the N-terminal domain of the protein t (51-57 aa) (Anton et al., 2002). A

peptide construct surrounding the EM-2-like peptide motif, referred as peptide Y-8-A, was synthesized and used in our SP-RIA for EM-1 (see material and methods) (Anton et al., 2002). Both Mx-1 peptide (which encodes an EM1-2-like peptide sequence motif at its C-terminus domain) and the peptide fragment —Y-8-A — were used to validate the specificity of the C-14 antiserum in the solid-phase RIA for EM-1. Quite interesting to note, is that detection of these endomorphin-like epitopes in our antibody-based screenings, support the high specificity and selectivity of both C-14/C-16 antisera to be used in several immunochemical techniques (Anton et al., 2007).

Previous studies have demonstrated the localization of endomorphin-like immunoreactive material within large-dense core vesicles (LDCV) in axon terminals of spinal cord neurons (Wang et al., 2002; Zadina, 2002) and hypothalamus (Wang et al., 2003) suggesting that endomorphin peptides may be released from neurons, as shown from different *in vitro* studies (Dun et al., 2000; Williams et al., 1999). These latter studies showed that EM-2-like peptide substances (detected by an immobilized antibody microprobe technique) are released from neurons upon the stimulation of dorsal root afferent fibers penetrating the substantia gelatinosa (laminae I and II) supporting thus, the premise of the endogenous origin and the neuronal release of endomorphins as active neuropeptides (Zadina et al., 1999, Zadina et al., 1997) as shown for enkephalins and other opioid peptides (Liu et al., 1996; Dillen et al., 1993). Supporting these latter studies, collected superfusates from K<sup>+</sup> (55mM)-evoked release material from superfused rat striatal slices were subjected to gel permeation chromatography studies, and SP-RIA for EM-1 (using C-14 antiserum) was used to detect EM1-IR in samples eluting from Sephadex G-50 columns and RP-HPLC used characterized the identity of the released immunoreactive peptide material (see material and methods, sections 2.8-2-10). Gel permeation chromatography analysis revealed the expression of EM1-IR in two predominant low molecular mass peptide components of ~1.0 and ~0.7 kDa, respectively, which were reduced into a single, immunoreactive peptide peak of ~0.6 kDa, upon exposure to trypsin/carboxipeptidase B treatment (figure 4). RP-HPLC analysis of detected immunoreactive peptide peaks showed to co-elute as a single peptide peak (with a retention time of  $\cong$  20 min) with synthetic EM-1 (figure 5). These results confirm not only that EM1-IR is released from brain tissue as a single peptide component of ~0.6 kDa that matches with the elution profile and molecular weight of synthetic EM-1 (Zadina et al., 1997) but argues in favor of the controversial endogenous and neuronal origin of these amide tetrapeptides, which appear to be processed and escinded from high molecular mass protein components that putatively encode immunoreactive peptide motifs of both endomorphin molecules, albeit that such short tetrapeptide sequences may be found in other protein molecules in the brain, as well.

Although, the antibody-based screening methodologies used in the present study support for the existence of endomorphin peptides synthesized and processed from putative mRNA transcripts into putative endogenous propeptide precursor(s) of endomorphin; the exact nature of specific proteins encoding active sequences of both EM-1 and EM-2 tetrapeptides will need the support of further recombinant DNA technology and cloning procedures to clarify the endogenous origin of these opioid substances, as shown for at least, the four major family of opioid peptides synthesized from large propeptide precursor proteins in the the brain of mammals (Dores et al., 2002).

Furthermore, our studies show that both specific and sensitive purified EM-1 (C14 A-APA) and EM-2 (C16 A-APA) antisera tested and validated in different antibody-based screening methodologies, were equally useful in immunohistochemical (IHC) studies, used to map the anatomical distribution and cellular expression of EM-IR along the rostro-caudal areas of the rat brain (see figures 5-12). These IHC studies show the wide-distribution of different labeling patterns and localized staining of EM1-like immunoreactive material in neurons and axon processes in the rat brain, using EM-1 antisera at a working dilution 1:50, as shown in figures 6-13. Most of the immunoreactive labeling detected in neurons along the rostro-caudal areas of the rat brain, showed major concordance with respect previous IHC studies that showed the asymmetric distribution and cellular expression of EM1-2-IR in the SNC of rodents (Whitten et al., 2001; Martin-Schild et al., 1999, 1997; Pierce et al., 1998).

Finally, the present study shows the generation and validation of two different polyclonal antigen-affinity purified antisera (C-14/C-16 A-APA) for EM-1 and EM-2 peptides that displayed a great versatility and high specificity for recognizing EM1-2 peptide sequences in diiferent immunochemical techniques. These antisera proved their usefulness, as as immunological probes, to detect EM1-2-IR material in several high-to-low molecular mass protein and peptide components synthesized in neurons, shown to localized in several rostro-caudal areas of the rat CNS. Antibody detection of EM1-IR as EM-1 peptide in evokely-released material into striatal superfusates strongly support for the biosynthetic origin of endomorphin peptides as mRNA-translated peptide products enzymatically processed from a still non-identified or characterized endogenous propeptide precursor(s). Further molecular and cloning techniques may clear the nature of this neuropeptides.

**Acknowledgments:** We gratefully thank the financial support of the following Institutions: UNAM MacroProject MP6-18, INPRFM Subcuenta-100; CONACYT-SEP-2004-C01-47804.

## REFERENCES

- Abbadie, C., Rossi, G.C., Orciuolo, A., Zadina, J.E., Pasternak, G.W., 2002. Anatomical and functional correlation of the endomorphins with mu opioid receptor-splice variants. *Eur J Neurosci* 16 ( 6): 1075-82.
- Aicher, S.A., Mitchell, J.L., Swanson, K.C., Zadina, J.E., 2003. Endomorphin-2 axon terminals contact mu-opioid receptor-containing dendrites in trigeminal dorsal horn. *Brain Res.* 977(2): 190-8.
- Anton, B., Matus, M., Leff, P., Calva, J.C., Acevedo, R., Hernandez, A., Medecigo, M., Valdez, A., Sanchez-Lopez, R., Vergara, P., Torner, C., Segovia, J. and Alagon, A., 2002. Mus musculus visinin-like protein 1 mRNA, complete cds. *ACCESSION* AY101375. In: *Gernbank NCBI*. Website, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer>.
- Asakawa, A., Inui, A., Momose, K., Ueno, N., Fujino, M.A., Kasuga, M., 1998. Endomorphins have orexigenic and anxiolytic activities in mice. *Neuroreport* 9 (10): 2265-7.
- Azuma, Y., Ohura, K., 2002. Endomorphins 1 and 2 inhibit IL-10 and IL-12 production and innate immune functions, and potentiate NF-kappaB DNA binding in THP-1 differentiated to macrophage-like cells. *Scand J Immunol* 56 (3): 260-9.
- Birgul, N., Weise, C., Kreienkamp, H.J., Richter, D., 1999. Reverse physiology in drosophila: identification of a novel allatostatin-like neuropeptide and its cognate receptor structurally related to the mammalian somatostatin/galanin/opioid receptor family. *EMBO J* 18(21): 5892-900.
- Bradbury, A.F., Smyth, D.G., Snell, C.R., Hulme, E.C., Birdsall, N.J.M., 1976. C-fragment of lipoprotein has high affinity for opiate receptors. *Nature* 260: 793-795.
- Brandenburg, C.A., May, V., Braas, K.M. 1997. Identification of endogenous sympathetic neuron pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): depolarization regulates production and secretion through induction of multiple propeptide transcripts. *J Neurosci* 17( 11) : 4045-55.
- Braunewell, K.H., Gundelfinger, E.D., 1999. Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. *Cell Tissue Res.* 295 (1): 1-12.

Brownstein, M.J., 1993. A brief history of opiates, opioid peptides and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (12): 5391-3.

Bruggemann, I., Schulz, S., Wiborny, D., Holtt V., 2000. Colocalization of the mu-opioid receptor and calcium/calmodulin-dependent kinase II in distinct pain-processing brain regions. *Brain Res Mol Brain Res* 85(1-2): 239-50.

Bujdoso, E., Jaszberenyi, M., Gardi, J., Foldesi, I., Telegdy, G., 2003. The involvement of dopamine and nitric oxide in the endocrine and behavioural action of endomorphin-1. *Neuroscience* 120 (1): 261-8.

Burger, E. 1988. Peptide hormones and neuropeptides. Proteolytic processing of the precursor regulatory peptides. *Arzneimittelforschung* 38 (5): 754-61.

Burgoyne, R.D., Morgan, A., 2003. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 83(2) : 581-632.

Champion, H.C., Bivalacqua, T.J., Zadina, J.E., Kastin, A.J., Hyman, A.L., Kadowitz, P.J., 2002. Role of nitric oxide in mediating vasodilator responses to opioid peptides in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29(3) : 229-32.

Chavkin, C., James, I.F., Goldstein, A, 1982. Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor. *Science* 215 (4531): 413-5.

Corbett, A.D., Patterson, S.J., & Kosterlitz, H.W. In *Opioids. Handbook of Exp. Pharmacol.* (Herz, A., ed) Springer Press, New York, Vol 104 (1) pp: 645-679.

Coventry, T.L., Jessop, D.S., Finn, D.P., Crabb, M.D., Kinoshita, H., Harbuz, M.S., 2001. Endomorphins and activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J Endocrinol* 169 (1): 185-93.

Czapla, M.A., Gozal, D., Alea, O.A., Beckerman, R.C., Zadina, J.E., 2000. Differential cardiorespiratory effects of endomorphin 1, endomorphin 2, DAMGO, and morphine. *Am J Respir Crit Care Med* 162 (3 Pt 1): 994-9.

Day, N.C., Lin, H., Ueda, Y., Meador-Woodruff, J.H., Akil, H., 1993. Characterization of pro-opiomelanocortin processing in heterologous neuronal cells that express PC2 mRNA. *Neuropeptides* 24 (5): 253-62.

Dillen, L., Miserez, B., Claeys, M., Aunis, D., De Potter, W., 1993. Posttranslational processing of proenkephalins and chromogranins/secretogranins. *Neurochem Int* 22(4):315-52.

Ding, Y.Q., Nomura, S., Kaneko, T., Mizuno, N., 1995. Co-localization of mu-opioid receptor-like and substance P-like immunoreactivities in axon terminals within the superficial layers of the medullary and spinal dorsal horns of the rat. *Neurosci Lett* 198 (1): 45-8.

Doi, N, Brown, C.H., Cohen, H.D., Leng, G., Russell, J.A., 2001. Effects of the endogenous opioid peptide, endomorphin 1, on supraoptic nucleus oxytocin and vasopressin neurones in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol* 132 (5) :1136-44.

Dores, R.M., Lecaude, S., Bauer, D., Danielson, P.B., 2002. Analyzing the evolution of the opioid /orphanin gene family. *Mass Spectrom Rev* 21(4): 220-43.

Dun, N.J., Dun, S.L., Wu, S.Y., Williams, C.A., Kwok, E.H., 2000. Endomorphins: localization, release and action on rat dorsal horn neurons. *J Biomed Sci* 7(3): 213-20.

Garcia-Tovar, C.G., Perez, A., Luna, J., Mena, R., Osorio, B., Aleman, V., Mondragon, R., Mornet, D., Rendon, A., Hernandez, J.M., 2001. Biochemical and histochemical analysis of 71 kDa dystrophin isoform (Dp71f) in rat brain. *Acta Histochemistry*; 103(2):209-24.

Glick, R.B., Pasternak, J.J., 1998. Recombinant DNA technology. In: Glick, R.B., Pasternak, J.J., (Eds.), *Molecular Biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA*. ASM Press, Wasington, D.C., pp: 45-77.

Glombik, M.M., Gerdes, H.H., 2000. Signal-mediated sorting of neuropeptides and prohormones: secretory granule biogenesis revisited. *Biochimie* 82(4): 315-26.

Goldberg, I.E., Grace, C.R., Lechtworth, S.R., Mathis, J.P., Ryan-Moro, J., Leventhal, L., Su W., Emmel, D., Bolan, E.A., Pasternak, G.W., 1998. Pharmacological characterization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mouse brain. *J Pharmacol and Exp Therap* 286(2): 1007-13.



Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L.I., Hunkapiller, M., Hood, L., 1979. Dynorphin (1-13) and extraordinary potent opioid peptide. *Proc. Natl Acad Sci USA* 79: 6666-70.

Gong J., Strong, J.A., Zhang, S., Yue, X., DeHaven, R.N., Daubert, J.D., Cassel, J.A., Yu, G., Mansson, E., Yu L., 1998. Endomorphins fully activate a cloned human mu opioid receptor. *FEBS Letters* 439: 152-156.

Gubler, U., Seeburg, P., Hoffman, B.H., Gage, P. & Udenfriend, S., 1982. Molecular cloning establishes proenkephalin as a precursor of enkephalin-containing peptides. *Nature* 295: 206-208.

Hackler, L., Zadina, J., Ge, L.G., Kastin, A.J., 1997. Isolation of relatively large amounts of endomorphin-1 and endomorphin-2 from the human cortex. *Peptides* 18(10): 1635-39.

Hannah, M., Jackson, S., Gillies, G., Lowry, P., 1993. Met-enkephalin secretion from mixed cultures of hypothalamic neurons and astrocytes. *Neuroendocrinol* 57(5): 884-91.

Harlow, E., Lane, D., 1999. Using Antibodies: A laboratory Manual. In: Harlow, E., Lane, D. (Eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp: 39-311.

Higashida, H., Hoshi, N., Knijnenik, R., Zadina, J.E., Kastin, A.J., 1998. Endomorphins inhibit high-threshold Ca<sup>2+</sup> channel currents in rodent NG108-15 cells overexpressing mu-opioid receptors. *J Physiol* 507(1): 71-75.

Hockfield, S., Carlson, S., Evans, C., Levitt, P., Pintar, J., Silberstein, L., 1993. Selected Methods for Antibody and Nucleic Acids Probes In: Hockfield, S., Carlson, S., Evans, C., Levitt, P., Pintar, J., Silberstein, L. (Eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp: 263-502.

Hook, V.Y., Loh, Y.P., 1984. Carboxypeptidase B-like converting enzyme activity in secretory granules of rat pituitary. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(9): 2776-80.

Hosohata, K., Burkey, T.H., Alfaro-Lopez, J., Varga, E., Hruby, V.J., Roeske, W.R., Yamamura, H.L., 1998. Endomorphin-1 and endomorphin-2 are partial agonists and the human mu-opioid receptor. *Eur J Pharmacol* 346: 111-114.

Huang, C., Wang, Y., Chang, J.K., Han, J.S., 2000. Endomorphin and mu-opioid receptors in mouse brain mediate the analgesic effect induced by 2 Hz but not 100 Hz electroacupuncture stimulation. *Neurosci Lett* 294(3): 159-62.

Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fotherhill, L.H., Morgan, B.A., Morris, H.R., 1975. Identification of two related pentapeptides from brain with potent opiate activity. *Nature (London)* 258: 577-579.

Kaufman, L.D., and Tobin, J.A., 1984. Prospects for the isolation of genes for receptors and other proteins of pharmacological and neurobiological interest. In: Venter, C.J., Harrison, L.C. (Eds.), *Cell Membrane: Molecular and Chemical Characterization of membrane receptors*. Liss A.R. Inc. Press, New York, pp: 241-259.

Kiebler, M.A., DesGroseillers, L., 2000. Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* 25 (1):19-28.

Kirchmair, R., Hoghe-Angueletti, R., Gutierrez, J., Fischer-Colbrie, R., Winkler, H., 1993. Secretoneurin- a neuropeptide generated in the brain, adrenal medulla and other neuroendocrine tissue by proteolytic processing of secretogranin II ( Chromogranin C) . *Neuroscience* 53: 359-365.

Kirchmair, R., Lettner, B., Fischer-Colbrie, R., Maksteiner, J., Hoghe-Angueletti, R., Winkler, H., 1995. Large variations in the proteolytic formation of chromogranin-A-derived peptide ( GEM-25) in neuroendocrine tissues. *Biochem J* 310: 331-336.

Kroesen, S., Maksteiner, J., Lettner, B., Hoghe-Angueletti, R., Fischer-Colbrie, R., Winkler, H., 1996. Rat brain: distribution of immunoreactivity of PEM-11, a peptide derived from Chromogranin B. *Eur J Neurosci* 8 (12): 2679-89.

Kurokawa, T., Suzuki, T., Hashimoto, H., 2003. Identification of gastrin and multiple cholecystokinin genes in teleost. *Peptides*; 24(2): 227-35. Kwok, E.H., Dun, N.J., 1998. Endomorphins decrease heart rate and blood pressure possibly by activating vagal afferents in anesthetized rats. *Brain Res.* 803(1-2): 204-7.

Li, CH., Chung, D., 1976. Isolation and structure of an untriakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1145-8. Liu, F., Housley, P.R., Wilson,

S.P., 1996, Initial processing of human proenkephalin in bovine chromaffin cells. *J Neurochem* 67(4):1457-62.

Loi, P.K., McGraw, H.F., Tublitz, N.J., 1997. Peptide detection in single cells using a dot immunoblot assay. *Peptides* 18(5): 749-53.

Lovisetti-Scamihorn, P., Liang, F., Leiner, B., De Potter, W., Winkler, H., 1999. Pig splenic nerve: peptides derived from chromogranins by proteolytic processing during axonal transport. *Reg Peptides* 79: 63-67.

Mansour, A., Fox, C.A., Akil, H., Watson, S.J., 1995. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* 18(1): 22-9.

Martin-Schild, S., Gerall, A.A., Kastin, A.J., Zadina, J.E., 1999. Differential distribution of endomorphin 1 and endomorphin-2-like immunoreactivities in the CNS of the rodent. *J Comp Neurol* 405: 450-17.

Martin-Schild, S., Zadina, J.E., Gerall, A.A., Vigh, S., Kastin, A.J., 1997. Localization of endomorphin-2-like immunoreactivity in the rat medulla and spinal cord. *Peptides* 18(10): 1641-9.

Mathisen, P.M., Johnson, J.M., Kawczak, J.A., Tuohy, V.K., 1999. Visinin-like protein (VILIP) is a neuron-specific calcium-dependent double-stranded RNA-binding protein. *J Biol Chem*. 274(44): 31571-6.

Meunier, J.C., Mollereau C., Toll L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J.L., Guillemot, J.C., Ferrara, P., Monsarrat, B., Mazarguil, H., Vassart, G., Parmentier, M., Costentin, J., 1995. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377 (6549): 532-5.

Mizoguchi, H., Narita, M., Oji, D.E., Suganuma, C., Nagase, H., Sora, I., Uhl, G.R., Cheng, E.Y., Tseng, L.F., 1999. The mu-opioid receptor gene-dose dependent reductions in G-protein activation in the pons/medulla and antinociception induced by endomorphins in mu-opioid receptor knockout mice. *Neuroscience* 94 (1): 203-7.

Monory, K., Bourin, M.C., Spetea, M., Tömböly, C., Tóth, G., Matthes, H.W., Kieffer, B.L., Hanoune, J., Borsodi, A., 2000. Specific activation of the mu opioid receptor (MOR) by endomorphin 1 and endomorphin 2. *European J Neurosci* 12: 577-584.

Muñoz, D.G., Kobylinski, L., Henri, D.D., George, D.H., 1990. Chromogranin-A-like immunoreactivity in the human brain: distribution in bulbar and cerebral cortex. *Neuroscience* 34 ( 3) : 533-543.

Nevo, I., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Bayewitch, M., Vogel, Z., 2000. Acute and chronic activation of the mu-opioid receptor with the endogenous ligand endomorphin differentially regulates adenylyl cyclase isozymes. *Neuropharmacology* 39 (3) : 364-71.

Nothacker, H.P., Reinscheid, R.K., Mansour, A., Henningsen, R.A., Ardati, A., Monsma, F.J. Jr, Watson, S.J., Civelli, O., 1996. Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16): 8677-82.

Peter, A., Toth, G., Tomboly, C., Laus, G., Tourwe, D., 1999. Liquid chromatographic study of the enzymatic degradation of endomorphins, with identification by electrospray ionization mass spectrometry. *Chromatogr A* 846 (1-2): 39-48.

Pierce, T.L., Grahek, M.D., Wessendorf, M.W., 1998. Immunoreactivity for endomorphin-2 occurs in afferents of rats and monkey. *Neuroreport* 9: 385-389.

Pierce, T.L., Wessendorf, M.W., 2000. Immunocytochemical mapping of endomorphin-2-immunoreactivity in rat brain. *J Chem Neuroanat* 18(4): 181-207.

Przelowcka, B., Mika, J., Labuz, D., Toth, G., and Przelowcki, R., 1999. Spinal analgesic action of endomorphins in acute, inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol* 367: 189-196.

Raynor, K., Kong, H., Chen, Y., Yasuda, K., Yu, L., Bell, G.I., Reisine, T., 1994. Pharmacological characterization of the cloned kappa- delta- and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 45(2): 330-4.

Reinscheid, R.K., Nothacker, H., Civelli, O., 2000. The orphanin FQ/nociceptin gene: structure, tissue distribution of expression and functional implications obtained from knockout mice. *Peptides* 21(7): 901-6.

Reinscheid, R.K., Nothacker, H.P., Bourson, A., Ardati, A., Henningsen, R.A., Bunzow, J.R., Grandy, D.K., Langen, H., Monsma, F.J. Jr., Civelli, O., 1995. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid-like G protein-coupled receptor. *Science* 270 (5237): 792-4.

Saito, Y., Maruyama, K., Saido, T.C., Kawashima, S., 1995. N23K, a gene transiently up regulated during neural differentiation, encodes a precursor protein for a newly identified neuropeptide nociceptin. *Biochem Biophys Res Commun* 217 (2): 539-45.

Sakurada, S., Watanabe, H., Hayashi, T., Yuhki, M., Fujimura, T., Murayama, K., Sakurada, C., Sakurada, T., 2002. Endomorphin analogues containing D-Pro2 discriminate different mu-opioid receptor mediated antinociception in mice. *Br J Pharmacol* 137 (8): 1143-6.

Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Díaz, M., DeAntonio, I., Garzon, 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-Islas, E., Ridaura, C., Acevedo, R., Morales, A., Calva, J.C., Valdez, A., León-Olea, M., Leff, P., Antón, B., 2000. Comparative immunohistochemistry for endomorphins and mu opioid receptor in the human pons-medulla and spinal cord. 30th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, *Neurosci Abstr* 30(1): 634.

Schreff, M., Schulz, S., Wiborny, D., Holtt, V., 1998. Immunofluorescent identification of endomorphin-2-containing nerve fibers and terminals in the rat brain and spinal cord. *Neuroreport* 9 (6): 1031-4.

Segovia, J., Vergara, P., Brenner, M., 1998. Differentiation-dependent expression of transgenes in engineered astrocyte cell lines. *Neuroscience Letters* 242(3):172-6.

Soignier, R.D., Vaccarino, A.L., Brennan, A.M., Kastin, A.J., Zadina, J.E., 2000. Analgesic effects of endomorphin-1 and endomorphin-2 in the formalin test in mice. *Life Sci* 67(8): 907-912.

Soreq, H. 1985. The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA-microinjected *Xenopus* oocytes. *CRC Crit Rev Biochem* 18(3): 199-238.

Spilker, C., Dresbach, T., Braunewell, K.H., 2002. Reversible translocation and activity-dependent localization of the calcium-myristoyl switch protein VILIP-1 to different membrane compartments in living hippocampal neurons. *J Neurosci* 22(17): 7331-9.

- Steiner, D.F., 1998. The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol* 2(1): 31-9.
- Ukai M, Watanabe Y, Kameyama T. 2001. Endomorphins 1 and 2, endogenous mu-opioid receptor agonists impair passive avoidance learning in mice. *Eur J Pharmacol.* 421(2): 115-9.
- Wang, Q.P., Zadina, J.E., Guan, J.L., Kastin, A.J., Shioda, S., 2003. Electron microscopic examination of the endomorphin 2-like immunoreactive neurons in the rat hypothalamus. *Brain Res* 969 (1-2): 126-34.
- Wang, Q.P., Zadina, J.E., Guan, J.L., Shioda, S., 2002. Morphological studies of the endomorphinergic neurons in the central nervous system. *Jpn J Pharmacol* 89 (3): 209-15.
- Williams, C.A., Wu, S.Y., Dun, S.L., Kwok, E.H., Dun, N.J., 1999. Release of endomorphin-2 like substances from the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 273 (1): 25-8.
- Xu, L., Depoortere, I., Tang, M., Peeters, T.L., 2001. Identification and expression of the motilin precursor in the guinea pig. *FEBS Lett* 490(1-2): 7-10.
- Yeung, C.M., Chow, B.K., 2001. Identification of a proglucagon cDNA from *Rana tigrina rugulosa* that encodes two GLP-1s and that is alternatively spliced in a tissue-specific manner. *Gen Comp Endocrinol* 124(2): 144-51.
- Yu X, Mao X, Blake AD, Li WX, Chang SL. Morphine and endomorphins differentially regulate micro-opioid receptor mRNA in SHSY-5Y human neuroblastoma cells *J Pharmacol Exp Ther*, 306(2): 447-54, 2003.
- Zadina, J.E., Hackler, L., Ge, L.J., Kastin, A.J., 1997. A potent and selective endogenous amount of endomorphin-1 and endomorphin-2 for the mu-opioid receptor. *Nature* 386: 449-502.
- Zadina, J.E., Martin-Schild, S., Gerall, A.A., Kastin, A.J., Hackler, L., Ge, L.C., Zhang, X., 1999. Endomorphins: Novel endogenous mu opiate receptor agonists in regions of high mu-opiate receptor density. *Ann NY Acad Sci* 897:136-144.
- Zadina, J.E., 2002. Isolation and distribution of endomorphins in the central nervous system. *Jpn J Pharmacol* 89(3): 203-8.